Untersuchungen über die Ausscheidung von Cortisol-Abbauprodukten im Urin Gesunder und Kranker

von

LUDWIG RAITH

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0003

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. H. Schwiegk

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSSCHEIDUNG VON CORTISOL-ABBAUPRODUKTEN IM URIN GESUNDER UND KRANKER

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwigs-Maximilians-
Universität zu München

vorgelegt von

Ludwig Raith

aus
München

1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

~~Mitberichterstatter: Dr. med. J. Kerl~~

Dekan: Prof. Dr. W. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 10. JULI 1962

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

LITERARISCHER TEIL

Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Experimentelle Aufgabe

II. Methodik

1. Ausgangsmaterial

2. Hormonanalysen

A. Quantitative Bestimmung von Cortisol und seinen wichtigsten Abbauprodukten im Urin.

B. Quantitative Bestimmung der unveresterten und der mit Glukuronsäure veresterten 17-Hydroxycorticosteroide im Urin nach PORTER und SILBER.

III. Versuchsergebnisse

IV. Statistik

DISKUSSION

I. Kritik der Methode

II. Diskussion der Versuchsergebnisse

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

ANHANG : VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

EINLEITUNG

Die von der Nebennierenrinde sezernierten Hormone werden nur zu einem geringen Prozentsatz unverändert im Urin ausgeschieden. Der weitaus größte Teil wird in biologisch inaktive Abbauprodukte umgewandelt, die mit Glukuron- oder Schwefelsäure verestert im Urin erscheinen (1).

Die Aufklärung der chemischen Struktur der Nebennierenrindenhormone durch KENDALL (2), REICHSTEIN (3), PFIFFNER (4) und WINTERSTEIN (5) ermöglichte es, chemische Reaktionen zum quantitativen Nachweis dieser Hormone im Urin und Blut auszuarbeiten.

Das chemische Grundgerüst aller Nebennierenrindenhormone, die in Mineralocorticoide, Glukocorticoide und Androgene unterteilt werden, ist das Steranmolekül. Die nahe chemische Verwandtschaft dieser Hormone beeinträchtigt wesentlich die Spezifität ihrer chemischen Bestimmungsmethoden in unfraktionierten Harn- oder Blutextrakten. Mit einer bestimmten Reaktion, meist einer Farbreaktion, wird deshalb in der Regel eine ganze Gruppe von Hormonen erfaßt.

[Zum Beispiel bei der Bestimmung der formaldehydabspaltenden Steroide nach LOWENSTEIN (6) und CORCORAN (7), der reduzierenden Wirkung von Chloroformextrakten nach HEARD und SOBEL (8), der alkaliempfindlichen Steroide nach STAUDINGER und SCHMEISSER (9, 10) oder der 17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN (11), der 17-Hydroxycorticosteroide nach PORTER und SILBER (12, 13) und der 17-ketogenen Steroide nach NORYMBERSKI (14)].

Trotz ihrer Unspezifität haben die chemischen Bestimmungsmethoden die zeitraubenden biologischen Methoden, die zum Nachweis der sogenannten "Cortinaktivität" dienten, verdrängt. In Zusammenhang mit ACTH-Belastungsuntersuchungen und Hypophysenhemmtesten wurden sie zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel bei der Diagnose endokriner Erkrankungen und Störungen.— Durch die Verbesserung der analytischen Methoden und insbesondere durch die Einführung der Papierchromatographie in

die Steroidchemie von ZAFFARONI (15, 16), BUSH (17), sowie NEHER und WETTSTEIN (18) wurde es möglich, einzelne Nebennierenrindensteroide aus Urinextrakten zu isolieren und quantitativ zu erfassen.

Cortisol (das physiologisch wirksamste Glukocorticoid) und einzelne Abbauprodukte dieses Hormons wurden im Tagesurin von Normalpersonen (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27) und Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz (28), Nebennierenrindenüberfunktion (19, 26, 29) und Adreno-genitalem Syndrom (30, 31, 32, 33) bestimmt. Die tägliche Ausscheidung dieser Hormone im Harn wurde ferner bei Schizophrenen (25), Hypertonikern (27) und nach ACTH-Stimulierung der Nebennierenrinde (19, 21, 34), sowie nach einem Trauma (34) untersucht.

Eine Standardmethode zur Bestimmung von Cortisol oder seinen Metaboliten im Urin hat sich noch nicht herauskristallisiert. Die von den verschiedenen Autoren angegebenen Methoden zur Isolierung und zum quantitativen Nachweis dieser Steroide weichen erheblich voneinander ab. Die Absolutwerte aller Untersuchungen können deshalb nur mit großen Vorbehalten miteinander verglichen werden.

Um zu vermeiden, daß aus einer veränderten Ausscheidung von Cortisol oder einzelner Abbauprodukte dieses Hormons im Urin falsche oder zu weitreichende Schlußfolgerungen gezogen werden, ist es notwendig, die einzelnen Faktoren (Sekretion, Stoffwechsel, Clearance und physikalisch-chemischer Zustand), die die Ausscheidung dieser Hormone beeinflussen, zu kennen.

Es sollen deshalb im literarischen Teil dieser Arbeit die wichtigsten Tatsachen über Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol, sowie über dessen physikalisch-chemischen Zustand im Blut und die Bedeutung der Nierenfunktion für die Ausscheidung dieses Hormons, dargestellt werden.

LITERARISCHER TEIL

I. Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol

Cortisol wird in der Zona fasciculata (35) der Nebennierenrinde aus aktiver Essigsäure über Cholesterin, Pregnenolon, Progesteron, 17α-Hydroxyprogesteron und 17α-Hydroxydesoxycorticosteron gebildet (36).

Die tägliche Produktion dieses Hormons wird von PETERSON (37) mit 25 mg pro Tag angegeben. FLOOD (38) fand bei 6 Normalpersonen eine tägliche Cortisolsekretion von 11,2 bis 20,5 mg.

Die von PETERSON (37) gefundene physiologische Halbwertszeit von Cortisol mit 1,83 Stunden zeigt, daß dieses Hormon im menschlichen Organismus rasch abgebaut wird.

Eine zentrale Stellung im Stoffwechsel von Cortisol nimmt dabei die Leber ein (39, 40).

Es sind aber auch Milz (41), Niere (41), lockeres Bindegewebe (42) und sogar Blut (43) in der Lage, Cortisol abzubauen. Ob diese Organe aber eine Rolle bei der p h y s i o l o g i s c h e n Inaktivierung dieses Hormons spielen, ist nicht geklärt. Neben Untersuchungen der im Harn ausgeschiedenen radioaktiven Abbauprodukte nach Injektionen von C-14 markiertem Cortisol (44) haben vor allem die Leberperfusionsversuche (45), sowie der Abbau von Cortisol oder einzelner Metaboliten durch Leberschnitten (46), oder Leberhomogenate (47, 48) und neuerdings auch durch isolierte, spezifische Fermentsysteme (46, 48), wertvolle Zusammenhänge im Stoffwechsel von Cortisol aufgedeckt.

Die Hauptabbaureaktionen von Cortisol, dessen chemische Struktur in Abbildung 1 dargestellt ist, sind:

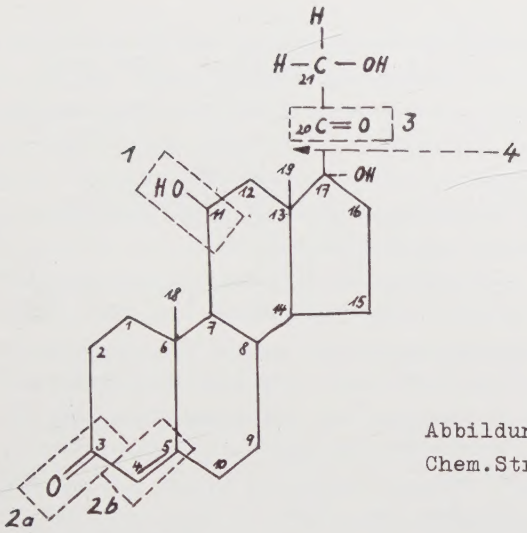


Abbildung 1:
Chem.Struktur von Cortisol

1. Nach Verabreichung von Cortisol oder Cortison wurden die gleichen Urinmetaboliten isoliert (49, 50). Daraus folgt, daß diese beiden Steroide ineinander umgewandelt werden können und sich zwischen Cortisol mit der 11-Hydroxygruppe und Cortison mit der 11-Ketogruppe spontan ein Gleichgewicht einstellt. GOLD (51) konnte nachweisen, daß diese Umwandlung der 11-Hydroxygruppe in eine 11-Ketogruppe und umgekehrt nur bei im Ring A ungesättigten Steroiden in größerem Umfang möglich ist. Tetrahydrocortisol zum Beispiel kann nur zu einem ganz geringen Prozentsatz in Tetrahydrocortison umgewandelt werden, obwohl es am C-Atom 11 dieselbe Konfiguration wie Cortisol hat.

2. Eine weitere Angriffsmöglichkeit sowohl für den Abbau von Cortisol als auch von Cortison, ist die Auflösung der Doppelbindung zwischen C-4und C-5. Es entstehen die entsprechenden alpha- und beta-Dihydroxyverbindungen von Cortisol und Cortison (52, 53). Alpha und beta bezieht sich dabei auf die Stellung des Wasserstoffatoms an C-5. Über die Ausscheidung dieser Dihydroderivate oder über ihre Konzentration im Blut ist nichts bekannt. FUKUSHIMA (44) konnte nach intravenöser Verabreichung von C-14-Cortisol keine radioaktiv markierten Dihydroverbindungen im Urin nachweisen, sondern hauptsächlich Tetra- und Hexahydroverbindungen. Dies spricht dafür, daß der Ring A sehr rasch zu den entsprechenden Tetrahydroverbindungen durch Reduktion der 3-Ketogruppe weiter umgebaut wird. (52,53)

Durch die Möglichkeit einer cis- trans-Stellung der entstehenden 3-Hydroxylgruppe gibt es sowohl von Cortisol, als auch von Cortison jeweils 4 verschiedene Tetrahydroverbindungen (3α,5ß - 3ß,5ß - 3α,5α - 3ß,5α). Die durch weitere Reduktion der 5 - a l p h a - Dihydroverbindungen entstandenen Tetrahydroderivate werden durch die Vorsilbe A L L O - gekennzeichnet. 3ß, 5α-Tetrahydrocortisol ist also identisch mit 3ß-Allo-Tetrahydrocortisol.
Von den insgesamt 8 möglichen Tetrahydroderivaten von Cortisol und Cortison erscheinen aber nur 3 in größerem Ausmaß, mit Glukuronsäure verestert, im Urin.
Es sind dies: 3α,5ß - Tetrahydrocortisol
3α,5α - Tetrahydrocortisol (= 3α-Allo-THF)
3α,5ß - Tetrahydrocortison

3. Die Reduktion der 20-Ketogruppe kann sowohl am Cortisol und Cortison, als auch an sämtlichen Tetrahydroderivaten stattfinden (54,55).
Die Dihydroverbindungen scheinen von den entsprechenden Enzymsystemen nicht angegriffen zu werden.
Die Reduktion der Seitenkette von Cortisol führt vorwiegend zu 20ß-Hydroxycortisol; dieselbe Reaktion führt bei Cortison jedoch vorwiegend zu 20α-Hydroxycortison (54).
Aus Urin wurde von PETERSON (56) sowohl 20ß-Hydroxycortisol, als auch das entsprechende 20α-Epimere isoliert.
Bei der Reduktion der 20-Ketogruppe der Tetrahydroverbindungen entstehen wiederum durch cis- trans- Isomerie jeweils 8 Hexahydrocortisole (zusammengefaßt als Cortole) und
8 Hexahydrocortisone (zusammengefaßt als Cortolone).
Von den theoretisch ableitbaren 16 Hexahydroverbindungen sind nur einige identifiziert.
Mit Glukuronsäure verestert konnten im Urin Gesunder nachgewiesen werden (44, 57, 58):
Cortol (= 3α, 5ß,20α-Hexahydrocortisol)
ß-Cortol (= 3α, 5α,20ß-Hexahydrocortisol)
Cortolon (= 3α, 5ß,20α-Hexahydrocortison)
ß-Cortolon (= 3α, 5α,20ß-Hexahydrocortison)-

4. Bis zu einem gewissen Grad ist bei Cortisol und all seinen Abbauprodukten eine Abspaltung der Seitenkette am C-Atom 17 möglich (59, 60).
Aus Cortisol entsteht durch diese Reaktion 11ß-Hydroxy-Δ-4-Androstendion und aus Cortison 3α-Hydroxyätiocholanolon-11,17 - dion.
Beide Steroide konnten im Urin als Cortisolabbauprodukte identifiziert werden (44).
Für Cortisol ist weiter eine Hydroxylierungsreaktion am C-Atom 6 nachgewiesen (61). Aus Urin konnte das entstehende 6α- und 6ß-Hydroxycortisol isoliert werden (61, 62, 63).

Z u s a m m e n f a s s e n d läßt sich über den Abbau von Cortisol sagen, daß es sich bei allen Reaktionen um enzymatisch gesteuerte Gleichgewichtsreaktionen handelt,

durch die Cortisol in biologisch weniger aktive oder inaktive Abbauprodukte übergeführt wird.—
Die Cortisolmetaboliten erscheinen zum größten Teil mit Glukuronsäure verestert im Urin (44, 64, 65).
Nach ISSELBACHER (66) geschieht diese Veresterung mit der 3α-Hydroxylgruppe des Steranskeletts. Ein geringer Prozentsatz der Cortisolabbauprodukte wird im Urin auch mit Schwefelsäure verestert ausgeschieden. Nach JAYLE (64), NEHER (65) und PASQUALINI (67) sind die Schwefelsäureester mit etwa 5 % an der Gesamtausscheidung von Cortisolmetaboliten beteiligt. Nur Cortisol (65), Cortison (65) und 6ß-Hydroxycortisol (62) werden in geringem Ausmaß unverestert im Urin ausgeschieden.
Der Anteil dieser 3 Hormone an der Gesamtausscheidung der Cortisolderivate beträgt jedoch weniger als 10 % (44).

Das quantitative Verhältnis der einzelnen Cortisolmetaboliten im Urin, wie es sich nach intravenöser Verabreichung von C-14 Cortisol aus der Radioaktivität der isolierten Metaboliten ergibt, zeigt die nach den Angaben von FUKUSHIMA (44) zusammengestellte Tabelle 1.

Cortisol-metabolit	% d.injizierten Cortisol - 4-C-14
Cortisol	< 2
THF	20
Allo-THF	10
Cortol	2
Allo-Cortol	0,5
ß-Cortol	10
ß-Allocortol	1
Cortison	< 2
THE	30
Cortolon	11
Allo-Cortolon	0,5
ß-Cortolon	10
ß-Allo-Cortolon	0
HO-E + 11-OE	2-12

Tabelle 1: Cortisolmetaboliten nach Verabreichung von C-14 Cortisol

Der physikalisch-chemische Zustand von Cortisol und seinen Abbauprodukten im Blut und die Bedeutung der Nierenfunktion für die Ausscheidung dieser Hormone im Urin:

Die Konzentration der unveresterten 17-Hydroxycorticosteroide im Blutplasma des Menschen, die nach den Untersuchungen von BUSH und SANDBERG (68) sowie NELSON (69) annähernd der Konzentration von unverestertem Cortisol entspricht, wird in der Literatur bei weitgehender Übereinstimmung zwischen 3 und 26 µg pro 100 ml Plasma angegeben (13, 70, 71, 72). Die Konzentration der veresterten 17-OHCS ist nach den Untersuchungen von BONGIOVANNI (73), KARL (71) und TAMM (74) in der gleichen Größenordnung wie die der unveresterten 17-OHCS.

Über die Konzentration einzelner Cortisolmetaboliten im Plasma liegen Untersuchungen von COHN und BONDY (75) vor, die in 100 ml Plasma 2,8 - 6,8 µg THF-Glukuronid (im Mittel 4,45 µg) und 3,2 - 13 µg THE-Glukuronid (im Mittel 7,96 µg) fanden.

In den physikalisch-chemischen Zustand der Nebennierenrindenhormone hat man erst durch die verbesserten analytischen Methoden und insbesondere durch die Anwendung von C-14 und H-3 radioaktiv markierten Steroiden Einblick gewonnen.

Es ist bekannt, daß eine Anzahl der im Blutplasma zirkulierenden biologisch bedeutsamen Substanzen teilweise oder ganz an Bluteiweißkörper gebunden ist.

Die Untersuchungen von DAUGHADAY (76, 77), WESTPHAL (78,79) und SANDBERG (80) ergaben, daß auch Cortisol in physiologischen Konzentrationen zu etwa 80 - 99 % an Eiweißkörper des Plasmas gebunden ist.

Nach DAUGHADAY (81,82,83) ist bei physiologischen Hormonkonzentrationen ein besonderes "corticosteroidbindendes Protein" mit großer Affinität, aber nur geringer Kapazität

für die Eiweißbindung dieses Hormons verantwortlich. Erst bei unphysiologisch hohen Hormonkonzentrationen sollen die Albumine als zweites c o r t i c o s t e r o i d - b i n d e n d e s S y s t e m wirksam werden. Im Vergleich zu dem postulierten corticosteroidbindenden Protein, das sich elektrophoretisch wie ein alpha-Globulin (83) verhält, haben die Albumine eine geringere Affinität zu den Corticoiden; wegen der großen Menge weisen sie aber eine ungleich höhere Kapazität auf.

Nach dem Vorschlag von SLAUNWHITE UND SANDBERG (84) wird das speziell die Nebennierenrindenhormone bindende Globulin " T R A N S C O R T I N " genannt.

In Bezug auf die Ausscheidung von Cortisol stellt die Glomerulumfiltration eine physiologische Ultrafiltration dar, in der die Kapillarmembran des Glomerulus als Ultrafilter wirkt. Durch die Bindung von Cortisol an Transcortin wird ein unökonomischer Verlust des aktiven Hormons verhindert.

Ob die Eiweißbindung der Nebennierenrindenhormone beim Transport dieser Hormone im menschlichen Organismus eine wesentliche Rolle spielt oder ob diese Bindung nur als Puffersystem wirkt (85), das eine optimale Konzentration des biologisch wirksamen Hormons gewährleistet oder welche Bedeutung ihr bei der Kontrolle der Sekretion sowie der Regulation des Stoffwechsels, der Verteilung und der Ausscheidung von Cortisol und seinen Metaboliten zukommt, ist nicht geklärt.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

I. EXPERIMENTELLE AUFGABE

Aufgabe des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit war es :

1. Eine für die Klinik brauchbare Methode zu entwickeln, mit der Cortisol und Cortison, sowie deren Hauptmetaboliten mit erhaltener Seitenkette am C-Atom 17 - Tetrahydrocortisol, Allo-Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison - im Urin quantitativ bestimmt werden können.
2. Mit der ausgearbeiteten Methode die tägliche Ausscheidung dieser Hormone bei Gesunden und Kranken zu untersuchen.
3. Bei allen der Hormonanalyse unterworfenen Urinen die Hormongruppe der 17-Hydroxycorticosteroide nach PORTER und SILBER in unveresterter und in mit Glukuronsäure veresterter Form zu bestimmen.

Es sollte geklärt werden, ob die Aussagen, die aus der Ausscheidung von 17-Hydroxycorticosteroiden über Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol möglich sind, durch den quantitativen Nachweis einzelner Nebennierenrindensteroide erweitert oder präzisiert werden können und ob sich dadurch neue Gesichtspunkte über die Funktion der Nebennierenrinde bei den untersuchten Patienten ergeben.

II. METHODIK

1. Ausgangsmaterial

Ausgangsmaterial war der in 24 Stunden ausgeschiedene Urin. Die Frage, ob eine längere Aufbewahrung des Urins die Hormonuntersuchungen beeinflußt, ist noch nicht geklärt (86).

Der Urin wurde deshalb innerhalb von 24 Stunden nach Beendigung der Sammelperiode aufgearbeitet.

2. H O R M O N A N A L Y S E N

A. BESTIMMUNG VON CORTISOL, CORTISON, TETRAHYDROCORTISOL, ALLO-TETRAHYDROCORTISOL UND TETRAHYDTOCORTISON IM URIN

Methodisches Schema:

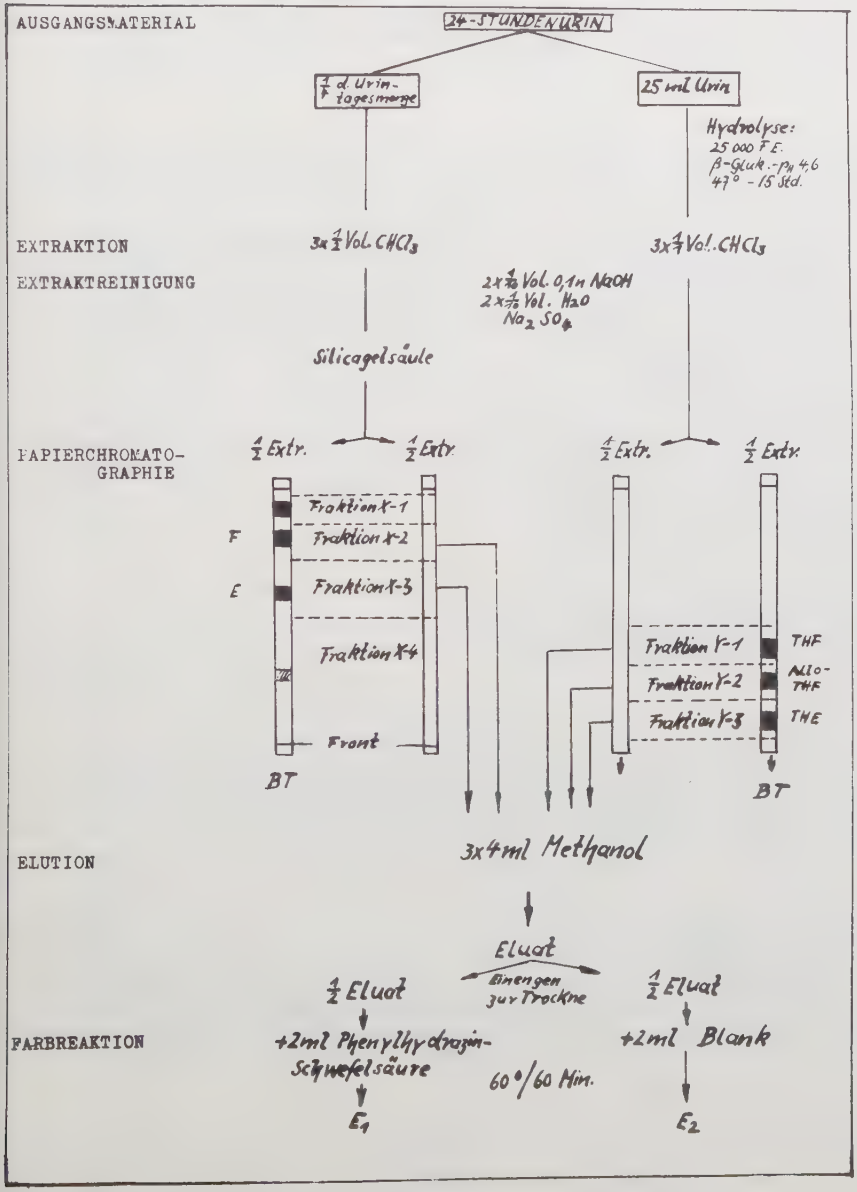


Abbildung 2: Methodisches Schema

Hydrolyse:

25 ml Urin wurden kurz erhitzt und mit 25 000 Fishman Einheiten ß-Glukuronidase (Fa.Schering), gelöst in 5 ml Wasser, bei einem p_H von 4,6 (eingestellt mit einem elektrischen p_H-Meter) und einer konstanten Temperatur von 47° Celsius 15 Stunden bebrütet.

Extraktion

Zur Bestimmung von unverestertem Cortisol und Cortison.

Ohne Hydrolyse wurde 1 Viertel der Urintagesmenge in einem 1000 ml Scheidetrichter mit 1/2 Volumen Chloroform mit einer automatischen Schüttelmaschine 30 Minuten geschüttelt. Der gesamte Inhalt des Scheidetrichters wurde anschließend in 100 ml Zentrifugengläser abgelassen und zur Trennung der Phasen hochtourig zentrifugiert. Der wässerige Überstand wurde abgesaugt und in den Scheidetrichter zurückgegossen.
Zweimalige Wiederholung des Extraktionsvorganges mit jeweils derselben Menge Chloroform

Zur Bestimmung von verestertem THF, Allo-THF und THE

Der hydrolysierte Urin wurde in einem 250 ml Scheidetrichter 3 mal mit je 60 ml Chloroform durch 30 Minuten langes automatisches Schütteln extrahiert.

Die so gewonnenen Chloroformrohextrakte wurden für die Bestimmung von Cortisol und Cortison sowie für die Bestimmung der veresterten Cortisolabbauprodukte - THF, Allo-THF und THE - mit Ausnahme der säulenchromatographischen Reinigung in gleicher Art und Weise, aber in 2 getrennten Arbeitsgängen weiterverarbeitet.

Extraktreinigung

Die Chloroformrohextrakte wurden 2 mal mit 1/10 Volumen 0,1n Ntronlauge und 2 mal mit 1/10 Volumen Wasser durch jeweils 10 Sekunden langes Schütteln gewaschen. Die zur Reinigung des Extraktes verwendete Natronlauge, sowie das Waschwasser wurden 1 mal mit 1/1 Volumen Chloroform rückextra-

hiert. Der gereinigte Chloroformextrakt wurde mit etwa 5 Gramm Natrium sulfuricum anhydricum (Fa. MERCK) getrocknet und anschließend durch ein Faltenfilter (Schleicher und Schüll Nr.588) filtriert. Rückextraktion des Natriumsulfats mit 30 ml Chloroform.

Der vorgereinigte Chloroformextrakt wurde mit einem Rotationsvakuumverdampfer bei einer Temperatur von 40° Celsius zur Trockne eingeengt.

Der Extrakt aus 1 Viertel der Urintagesmenge zur Bestimmung von Cortisol und Cortison wurde zusätzlich säulenchromatographisch gereinigt.

Die Chromatographiesäulen (Durchmesser 1 cm - Glasfritte G_1) wurden mit etwa 3 Gramm Silicagel (Fa. DAVISON, Mesh Size 100 - 200), aufgeschwemmt in frisch destilliertem Chloroform, beschickt. Nach quantitativer Übertragung des Chloroformextraktes wurden störende Lipide sowie schwach polare Steroide mit 50 ml Chloroform p.A. (enthält 1% Aethylalkohol) ausgewaschen (= Fraktion I).

Cortisol und Cortison wurden mit 50 ml 5% Methanol-Chloroform eluiert (= Fraktion II).

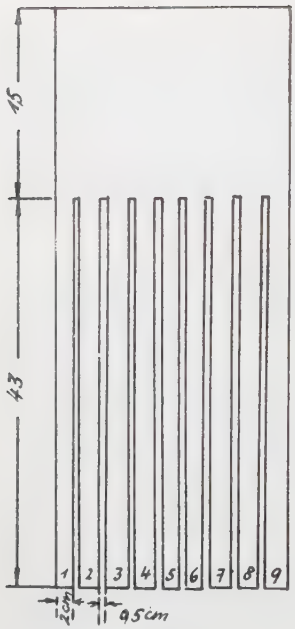
Diese Fraktion wurde bei einer Temperatur von 40°C zur Trockne eingeengt. Der Trockenrückstand wurde in 4 ml Chloroform-Methanol (Volumenverhältnis 1:1) gelöst und jeweils eine Hälfte in ein Spitzglas übertragen. Das Lösungsmittel wurde wiederum abgedampft.

PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Chromatographiert wurde absteigend mit dem System BUSH B-5, das sich aus Benzol - Methanol - Wasser im Verhältnis 2:1:1 zusammensetzt (87).
WHATMAN FILTERPAPIER Nr.1 wurde in der aus Abbildung 3 ersichtlichen Größe zurechtgeschnitten.

Die halbierten Extrakte wurden in 0,1 ml Methanol - Chloroform gelöst und in der angegebenen Reihenfolge unter Zuhilfenahme eines Föhns mit einer Kapillare am Startpunkt der Chromatogramme aufgetragen. 4-maliges Nachspülen mit jeweils 0,05 ml des Methanol-Chloroformgemisches sichert die quantitative Übertragung auf das Papier.

Nach einer 1-stündigen Equilibrierdauer wurden die Chromatogramme bei einer Temperatur von 23 - 24°C entwickelt. Die Laufzeit betrug unter diesen Bedingungen für die Auftrennung von Cortisol und Cortison etwa 5-6 Stunden. Zur Auftrennung der Tetrahydroverbindungen, insbesondere zur Trennung von ALLO-THF und THE war ein Durchlaufchromatogramm mit einer Laufzeit von 26 Stunden notwendig.



Nr.	Auftrag	Weiterverarbeitung
1	Leerstreifen	-
2	Testsubstanzen	BT
3	1/2 Extrakt E_1	PS
4	1/2 Extrakt E_1	PS
5	Testsubstanzen	BT
6	1/2 Extrakt E_2	PS
7	1/2 Extrakt E_2	BT
8	Testsubstanzen	BT
9	Leerstreifen	-

BT = anfärben mit Blau-Tetrazollösung
PS = Elution der den BT positiven Flecken entsprechenden Zonen und quantitative Auswertung mit der PORTER-SILBER-Reaktion.

Abbildung 3:

Größe d. Papierstreifen und Schema der Auftragung für die Urinextrakte

IDENTIFIZIERUNG EINZELNER NEBENNIERENRINDENSTEROIDE

Als Testsubstanzen dienten folgende kristallinen Steroide:

1. Cortisol = Compound F (Fa.Schering)
2. Cortison = Compound E (Fa.Schering)
3. Reichstein's Substanz S (Fa.Schering)
4. Corticosteron = Compound B (Fa.Schering)
5. Tetrahydrocortisol
6. Tetrahydrocortison

Die beiden Tetrahydroverbindungen wurden uns freundlicherweise von Dr.W.Klyne - London überlassen.

Die lufttrockenen Chromatographiestreifen mit der einen Hälfte des Extraktes wurden rasch durch eine frisch bereitete Mischung von 1 Volumen 0,1 %-iger wäßriger Blautetrazollösung und 9 Volumen 2n Natronlauge gezogen.

Diese Reaktion ist spezifisch für die reduzierende Seitenkette oder Ringketole, sowie für Δ-4-3-Ketone (87).

Die Färbung der Chromatographiestreifen nach Auftrennung der Extrakte aus 1/4 der unbehandelten Urintagesmenge zeigte dabei folgendes Bild (Abbildung 4):

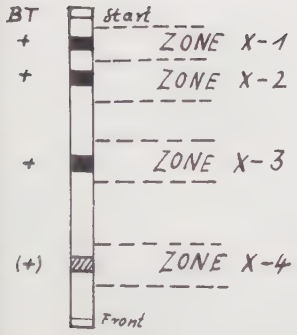


Abbildung 4:

Mit Blautetrazol gefärbte Chromatografiestreifen nach Auftrennung der Extrakte aus 1/4 der unbehandelten Urintagesmenge.

Die Zonen X-1, X-2 und X-3 waren meist deutlich erkennbar. Die Zone X-4 war bei der Mehrzahl der gefärbten Chromatographiestreifen nur angedeutet; sehr häufig fehlte sie völlig.

Die Blau-Tetrazolfärbung der Chromatographiestreifen, auf denen die nach fermentativer Spaltung der Glukuronide gewonnenen Chloroformextrakte aufgetrennt wurden, ließ 3 deutliche Zonen hervortreten: Die Abbildung 5 zeigt die ungefähre Lage der angefärbten Flecken nach einer 26-stündigen Laufzeit der Chromatogramme:

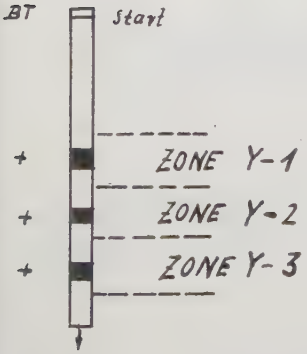


Abbildung 5:

Mit Blautetrazol gefärbte Chromatographiestreifen nach Auftrennung des Extraktes zur Bestimmung der Tetrahydroverbindungen von Cortisol

Die Zone Y-2 war dabei weitaus am schwächsten anfärbbar.

Zur Identifizierung der Zonen X-1 bis X-3 und Y-1 bis Y-3 wurden außer der Blau-Tetrazolreaktion folgende Kriterien herangezogen:

UV - Absorption

Alle Steroide mit einer α,ß-ungesättigten Oxogruppe absorbieren Licht mit einer Wellenlänge von 240 mμ (88).
Bei der Betrachtung der Chromatogramme im ultravioletten Licht (Original Hanau-Lampe) waren die Zonen X-2 und X-3 konstant positiv, X-1 nur in einem Teil der untersuchten Fälle und Y-1, Y-2 und Y-3 immer negativ.

Natronlaugefluoreszenz

Da sich die Natronlaugefluoreszenz sehr leicht mit der Blautetrazolreaktion kombinieren läßt, wurde sie zusätzlich zur Identifizierung herangezogen.
Die mit Blau-Tetrazol gefärbten Chromatographiestreifen wurden 10 Minuten in den Wärmeschrank bei einer Temperatur von 90 Grad Celsius gehängt.

Die Δ^4-3-Ketosteroide (z.B. Cortisol und Cortison) zeigen nach dieser Vorbehandlung im ultravioletten Licht eine gelbe Fluoreszenz (87).

Diese Reaktion war immer positiv für die Zonen X-2 und X-3, für die Zone X-1 in einem Teil der untersuchten Chromatogramme und immer negativ für die Zonen Y-1 bis Y-3.

R_F- und R_S-Werte im System BUSH B_5

Die R_F und R_S-Werte wurden berechnet nach den definierten Formeln:

$$R_F = \frac{\text{Distanz Start - Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start - Lösungsmittelfront}}$$

$$R_S = \frac{\text{Distanz Start - Mittelpunkt des Fleckes}}{\text{Distanz Start - Mittelpunkt des Fleckes einer Vergleichssubstanz}^*}$$

*Als Vergleichssubstanz diente Cortisol.

In der Tabelle 2 sind die errechneten R_F- und R_S-Werte der Reinsubstanzen und der einzelnen Zonen der Papierchromatogramme zusammengestellt:

HORMON	F	E	S + B	THF	THE	-
R_F	0,30 0,26-0,35	0,50 0,46-0,56	0,80 0,78-0,83	—	—	—
R_S	1,0 -	1,75 1,67-1,81	2,96 2,90-3,01	0,48 0,45-0,50	0,81 0,79-0,84	-
ZONE	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3
R_F	keine einheitliche Zone	0,28 0,26-0,30	0,50 0,48-0,54	—	-- --	
R_S	-	1,02 0,95-1,07	1,83 1,80-1,92	0,45 0,42-0,48	0,63 0,62-0,64	0,82 0,76-0,84

Tabelle 2: R_F und R_S-Werte der Testsubstanzen und der einzelnen Zonen der Papierchromatogramme im System BUSH B_5

Spektrophotometrische Charakterisierung der Eluate

Die spektrophotometrische Charakterisierung der Eluate erfolgte nach der von ZAFFARONI angegebenen Methode (89). Der Trockenrückstand der Eluate wurde in 3 ml konz. Schwefelsäure gelöst, 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend in Quarzkuvetten mit dem automatischen Beckmann Modell DU die Extinktionskurve in einem Wellenbereich von 220 bis 700 mμ geschrieben. Als Leerwert diente das Eluat eines subtanzfreien, entsprechend großen Chromatographiestreifens.

In der Tabelle 3 sind die Maxima der Spektralkurven der Reinsubstanzen und der einzelnen Zonen zusammengestellt:

HORMON	λ Maximum der Schwefelsäure Spektralkurve [mμ]	ZONE	λ Maximum der Schwefelsäure Spektralkurve [mμ]
F	240, 280, 390, 475	X_2	235, 275, 390, 475
E	---	X_3	---
THF	- 330, 420, 510	Y_1	- 320, 420, 510
-	- - - -	Y_2	unbrauchbar
THE	- 325, 405 -	Y_3	- 325, 405 -

Tabelle 3: Maxima der Schwefelsäure-Spektralkurven

Rechromatographie der einzelnen Fraktionen im System BUSH C und BL_1.

Die im System BUSH B_5 Blautetrazol positiven Zonen wurden im System Bush C (Toluol - Äthylazetat - Methanol - Wasser im Verhältnis 90 : 10 : 50 : 50) und BL_1 (Petroläther - Benzol - Methanol - Wasser im Verhältnis 3 : 7 : 5 : 5) rechromatographiert.
Die in diesen Systemen gefundenen R_F- und R_S-Werte für die Reinsubstanzen, sowie für die einzelnen Zonen der Papierchromatogramme, zeigt die Tabelle 4

HORMON ZONE	R_F	R_S	HORMON ZONE	R_F	R_S
F	0,13	1,0	THF	0,15	0,57
E	0,29	2,3	THE	0,25	0,80
X_2	0,13	1,0	Y_1	0,16	0,55
X_3	0,29	2,3	Y_2	0,19	0,68
			Y_3	0,23	0,82
SYSTEM BL_1			SYSTEM BUSH C		

Tabelle 4: R_F- und R_S-Werte der Testsubstanzen und der einzelnen rechromatographierten Zonen X-2 und X-3, sowie Y-1 bis Y-3 im System Bush C und BL_1

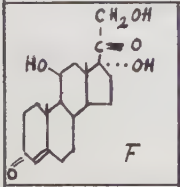
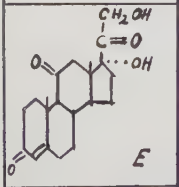
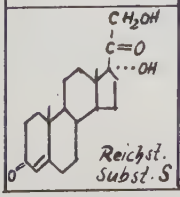
SYSTEM B_5	UV	BT	NaOH fluo	R_F	R_S	PS	λ Maxim. d. HSO_4	BL_1 R_F	BL_1 R_S	STEROID
Start										
ZONE X_1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	keine einheit. Zone
ZONE X_2	+	+	+	0,28	1,02	+	235,275 390,475	0,13	1,0	CORTISOL
ZONE X_3	+	+	+	0,50	1,83	+	-	0,29	2,3	CORTISON
ZONE X_4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	nicht identifiziert
Front										
REINSUBST.										
 F	+	+	+	0,30	1,0	+	240,280 390,475	0,13	1,0	
 E	+	+	+	0,50	1,75	+	-	0,29	2,3	
 Reichst. Subst. S	+	+	+	-	-	+	-	0,68	5,5	

Abbildung 6 : Zusammenstellung der Ergebnisse zur Identifizierung von aus Urin isoliertem Cortisol und Cortison

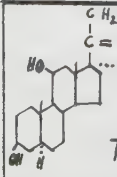
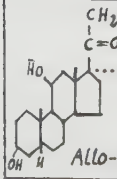
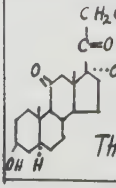
SYSTEM B_5	UV	BT	NaOH fluo	R_F	R_S	PS	λ Max. H_2SO_4	BUSH C R_F	BUSH C R_S	STEROID
Start										
ZONE Y_1	-	+	-	-	0,45	+	320,420 510	0,16	0,55	THF
ZONE Y_2	-	+	-	-	0,63	+	-	0,19	0,68	AlloTHF
ZONE Y_3	-	+	-	-	0,82	+	325,405	0,23	0,82	THE
REINSUBST.										
 THF	-	+	-	-	0,48	+	330,420	0,15	0,57	
 Allo-THF	-	+	-	-	-	+	-	-	-	
 THE	-	+	-	-	0,81	+	325,405	0,80		

Abbildung 7 : Zusammenstellung der Ergebnisse zur Identifizierung von aus Urin isoliertem THF, Allo-THF und THE

Z U S A M M E N F A S S U N G der Ergebnisse zur Identifizierung einzelner Nebennierenrindenhormone.

In den Abbildungen 6 und 7 sind die Untersuchungsergebnisse zur Identifizierung einzelner aus Urin isolierter Nebennierenrindensteroide übersichtlich zusammengestellt.

Die Zone X-1 setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen (wahrscheinlich unverestertes THF und THE, sowie ein UV-positives nicht identifiziertes Steroid). Quantitativ wurde diese Zone nicht ausgewertet, da die Aussagemöglichkeiten wegen ihrer Uneinheitlichkeit sehr beschränkt sind.

Zone X-2 und X-3, die vorwiegend unverestertes Cortisol und Cortison enthalten, wurden quantitativ bestimmt.

Da nur 1 Chromatographiesystem zur Auftrennung verwendet wurde, ist es bei der großen Anzahl der im Urin erscheinenden Nebennierenrindensteroide möglich, daß kleinste Mengen anderer Steroide mit ähnlichem R_F-Wert miterfaßt werden.

Die Schritte zur Identifizierung der Zonen Y-1 bis Y-3 haben gezeigt, daß sie THF, Allo-THF und THE enthalten. Da sie die Hauptmetaboliten von Cortisol darstellen, wurden sie ebenfalls quantitativ bestimmt.

Wegen der relativ kleinen Urinausgangsmenge, die zur quantitativen Bestimmung dieser Steroide diente, ist die Möglichkeit, daß noch andere Steroide miterfaßt werden und die Ergebnisse dadurch unkontrollierbar beeinflußt werden, gering.

Quantitative Auswertung

Die den Blau-Tetrazol positiven Flecken entsprechenden Zonen des 2.Chromatographiestreifens mit der zweiten Hälfte des Extraktes wurden ausgeschnitten und 3 mal mit je 4 ml Methanol p.A. (Fa. MERCK) durch jeweils 30-minütiges Überschichten der Papierstückchen in einem Reagenzglas bei einer Temperatur von 40° eluiert. Die Eluate wurden vereinigt, filtriert (Schleicher und Schüll Nr.588-Rundfilter) und halbiert. Jeweils eine Hälfte wurde in mit einem Schliffstopfen verschließbare Spitzgläser A und B übergeführt und das Lösungsmittel bei 40 Grad Celsius und vermindertem Druck abgedampft.

Farbreaktion:

Die Trockenrückstände in den Spitzgläsern A und B wurden in jeweils 4 ml frisch destilliertem Chloroform gelöst. Zu der Probe in Spitzglas A wurden 2 ml Phenylhydrazin-Schwefelsäure-reagenz gegeben* und zu demjenigen in Spitzglas B, 2 ml Blank** Anschließend wurde 1 Minute kräftig geschüttelt und nach Trennung der Phasen die untere Chloroformphase mit einer Kapillare abgesaugt. Zur Entwicklung des Farbkomplexes kamen beide Proben 60 Minuten bei einer Temperatur von 60 Grad Celsius in den Ultrathermostaten.

Die Extinktionen beider Proben wurden mit 10 mm OS-Küvetten im Beckman Spektralphotometer Modell DU bei einer Wellenlänge von 410 mμ gegen Blank, beziehungsweise Phenylhydrazin-Schwefelsäure-Reagenz gemessen. Es ergibt sich dann:

$$E_x = E_1 - E_2 - L$$

worin E_1 = Extinktion des Reagenzwertes, gemessen gegen Phenylhydrazin-Schwefelsäure

E_2 = Extinktion des Blankwertes, gemessen gegen Blank

L = Papierleerwert (Elution eines der zu untersuchenden Zone in der Größe genau entsprechenden Papierstreifen und quantitative Bestimmung des Eluats wie beschrieben).

Die dem Wert von E_x entsprechende Hormonmenge in μg wurde an der für die einzelnen Zonen in Frage kommenden Eichkurve (siehe Identifizierung einzelner Fraktionen) abgelesen. Für Cortisol, Cortison THF und THE wurde jeweils eine eigene Eichkurve aufgestellt.

Da wir von Allo- THF keine Reinsubstanz besaßen, diente für die quantitative Auswertung der Zone Y-2, die Allo-THF enthält, THF als Bezugssubstanz.

---

* 65 mg Phenylhydrazinhydrochlorid, 4 mal aus heißem Äthanol rekristallisiert, gelöst in 50 ml Äthanol + 100 ml verdünnte Schwefelsäure(= 190 ml konz. Schwefelsäure + 310 ml Wasser)

**50 ml Äthanol + 100 ml verdünnte Schwefelsäure w.o.

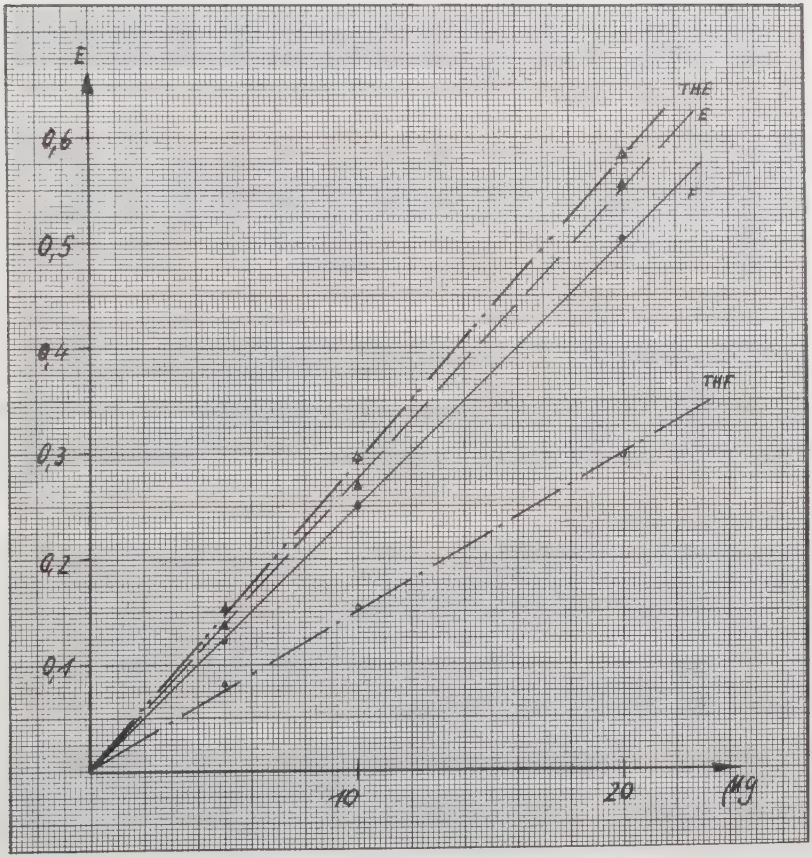


Abbildung 8: Eichkurven zur quantitativen Bestimmung von Cortisol, Cortison, Tetrahydrocortisol, Allo-Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison.

B. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER UNVERESTERTEN UND DER MIT GLUKURONSÄURE VERESTERTEN 17-HYDROXYCORTICOSTEROIDE IM URIN NACH PORTER UND SILBER (13).

Hydrolyse

3 ml des zu untersuchenden Urins wurden ganz kurz erhitzt. Nach Zugabe von 3000 Fishman-Einheiten ß-Glukuronidase (Fa.Schering), gelöst in 0,5 ml Aqua dest. wurde mit 50%-iger Essigsäure ein pH von 4,6 ± 0,1 eingestellt und 15 Stunden bei einer Temperatur von 47°C bebrütet.

Extraktion

Die zu untersuchende Urin-Probe (bei der Bestimmung der unveresterten 17-OHCS 10 ml Urin ohne Vorbehandlung) wurde in einem 50 ml-Scheidetrichter mit 35 ml frisch destilliertem Chloroform durch 2 Minuten langes Schütteln mit der Hand extrahiert, der gesamte Inhalt des Scheidetrichters in ein 50 ml Zentrifugenglas abgelassen und bei 4000 Umdrehungen pro Minute 5 Minuten zentrifugiert.

Extraktreinigung

Der Chloroformextrakt wurde 1 mal mit 3,5 ml 0,1n Natronlauge und 1 mal mit 3,5 ml Aqua dest. durch jeweils 10 Sek. langes Schütteln mit der Hand gewaschen.
Auf die Rückextraktion der zur Reinigung des Extraktes verwendeten Natronlauge, sowie des Waschwassers wurde verzichtet, da bei den durchgeführten Vergleichsbestimmungen die Untersuchungsergebnisse im Rahmen der Fehlerbreite dieser Methode nicht beeinflußt wurden.

Farbreaktion und quantitative Auswertung

Jeweils 14 ml des mit Natriumsulfat getrockneten Chloroformextrakts wurden in 2 vollkommen trockene 25 ml-Scheidetrichter pipettiert. Nach Zugabe von 3 ml Phenylhydrazin-Schwefelsäure bzw. 3 ml Blank wurde 30 Sekunden kräftig geschüttelt und nach Trennung der Phasen die Chloroformphase abgelassen und verworfen. Die noch im Scheidetrichter verbliebene obere Phase (Phenylhydrazin-Schwefelsäurereagenz bzw. Blank) wurde jeweils in ein Reagenzglas abgelassen. Zur Entwicklung der Porter-Silber-Chromogene kamen beide Proben 60 Minuten bei einer Temperatur von 60° ± 0,1°C in den Ultrathermostaten. Nach Abkühlung wurden die Extinktionen der Proben mit dem Beckman-Spektralphotometer Modell DU bei einer Wellenlänge von 410 mµ mit 10 mm OS Küvetten gegen Blank bzw. reines Phenylhydrazin-Schwefelsäurereagenz gemessen.

Die Extinktion E_x der in den 14 ml des Chloroformextraktes enthaltenen unveresterten bzw. veresterten 17-OHCS ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$E_x = E_1 - E_2$$

wobei:

E_1 = Extinktion des Reagenzwertes, gemessen bei einer Wellenlänge von 410 mμ gegen Phenylhydrazin-Schwefelsäurereagenz als Leerwert.

E_2 = Extinktion des Blankwertes, gemessen bei 410 mμ gegen Blank.

Die dem Wert von E_x entsprechende Hormonmenge in μg wurde bei der Bestimmung der unveresterten 17 - OHCS an der mit Hydrocortison und bei der Bestimmung der veresterten 17 - OHCS an der mit Tetrahydrocortison aufgestellten Eichkurve abgelesen.

Die an der Eichkurve abgelesene Hormonmenge in μg entspricht bei der Bestimmung der unveresterten 17-OHCS dem Hormongehalt von 4,0 ml Urin; bei der Bestimmung der veresterten 17-OHCS demjenigen von 1,2 ml Urin.

Umrechnung auf die in der gesamten Tagesmenge enthaltenen unveresterten und veresterten 17-OHCS!

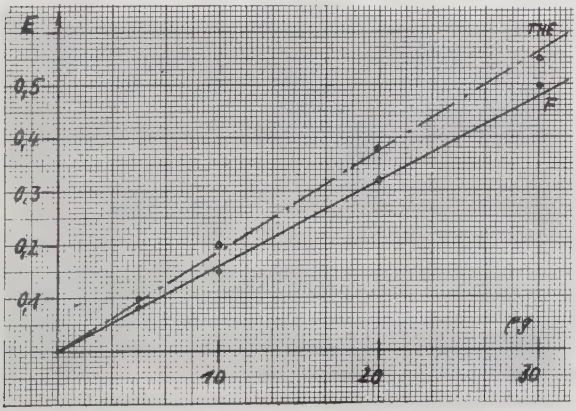


Abbildung 9: Eichkurven für die Bestimmung der unveresterten und der mit Glukuronsäure veresterten 17-Hydroxycorticosteroide.

III. Versuchsergebnisse

Cortisol, Cortison, Tetrahydrocortisol, Allo-Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison wurden nach der ausgearbeiteten Methode und die unveresterten und die mit Glukuronsäure veresterten 17-OHCS nach der Methode von PORTER und SILBER im 24-Stundenurin quantitativ bestimmt bei:

a. 15 normalgewichtigen Vergleichspersonen im Alter von 16 bis 71 Jahren (s.Tab.5)
b. 10 fettsüchtigenPatienten mit einem Übergewicht von 33 bis 136% im Alter von 13 bis 50 Jahren (s.Tab.6)
c. 1 Pat. mit Hirsutismus und 2 Fettsüchtigen nach einer 8-stündigen Infusion von 25 I.E. ACTH, gelöst in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung (s.Tab.7)
d. 1 Normalperson und 2 adipösen Patienten nach einem 24-stündigen Nahrungsentzug (s.Tab.8)
e. 5 Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion (s.Tab.9)
f. 7 Patienten mit endokrinen Erkrankungen (s.Tab.10)

Die Ergebnisse der Hormonanalysen und deren statistische Auswertung sind in den Tabellen 5-10 zusammengestellt.

Im 24-Stundenurin der 15 Normalpersonen wurden im Mittel 44,7 µg Cortisol, 40,6 µg Cortison, 1,51 mg THF, 0,61 mg Allo- THF und 2,73 mg THE gefunden. Die Bestimmung der unveresterten 17 - OHCS ergab im Mittel 460,4 µg und die der veresterten 17-OHCS im Mittel 5,65 mg pro Tag. Das Verhältnis von Cortison zu Cortisol war im Mittel 1 : 1,2 (von 1:0,8 bis 1:1,9), das der unveresterten 17-OHCS zu den veresterten 17-OHCS 1 : 13,3 (von 1:4 bis 1:25) und das von THF zu THE 1 : 1,8 (von 1:1,2 bis 1:2,8).

Von den 10 Fettsüchtigen wurden im Mittel 75,3 µg Cortisol, 40,0 µg Cortison, sowie 2,35 mg THF, 0,75 mg Allo-THF und 6,71 mg THE pro Tag ausgeschieden. Die Bestimmung der unveresterten 17-OHCS im 24-Stundenurin ergab im Mittel 452,5 µg

und die der veresterten 17-OHCS 9,95 mg. Cortison verhielt sich zu Cortisol im Mittel wie 1 : 1,9 (von 1:0,8 bis 1:3,3), die unveresterten 17-OHCS zu den veresterten wie 1 : 22,7 (von 1:14,8 bis 1:27,3) und THF zu THE wie 1 : 3,0 (von 1:1,8 bis 1:4,6).

Die Infusion von ACTH steigerte die Ausscheidung aller untersuchten Steroide, insbesondere aber die Ausscheidung von freiem Cortisol (bis 800 µg pro Tag).

Das Verhältnis von Cortison zu Cortisol war bei Pat.Nr.2 mit 1:5,0 und auch bei Pat.Nr. 3 mit 1 : 8,8 stark zu Gunsten von Cortisol verschoben. Die unveresterten 17-OHCS verhielten sich zu den veresterten wie 1 : 34,2 (Pat.Nr.2) beziehungsweise wie 1 : 37,5 (Pat.Nr.3) und THF zu THE bei Pat.Nr.1 wie 1 : 1,2, bei Pat.Nr. 2 wie 1 : 4,6 und bei Pat.Nr.3 wie 1 : 1,4.

Die Ergebnisse der Hormonanalysen nach einem 24-stündigen Nahrungsentzug ließen bei den Patientinnen 1 und 2 keine Besonderheiten in Bezug auf Quantität oder Verhältnis der einzelnen Steroide zueinander erkennen. Nur Patientin 3, bei der der 24-Stundenurin in zwei 12-Stundenportionen gesammelt wurde, zeigte in der zweiten Hälfte der Sammelperiode einen starken Anstieg von Cortisol auf 320 µg in 12 Stunden. Die Tagesausscheidung von freiem Cortisol war mit 395 µg stark erhöht.

In den ersten 12 Stunden der Sammelperiode wurden 0,6 mg THF, 0,3 mg Allo - THF und 1,5 mg THE ausgeschieden, in den zweiten dagegen 1,1 mg THF, 0,4 mg Allo - THF und 2,7 mg THE.

Die Ausscheidung von Cortsiol oder seinen Hauptmetaboliten war bei den Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion an der unteren Grenze der Norm oder deutlich vermindert. Eine Ausnahme bildete nur Patientin 3, bei der die Ausscheidung von unverestertem Cortisol mit 114 µg pro Tag - im Vergleich zu Normalpersonen - deutlich erhöht war. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erübrigt sich wegen der verschiedenen

Ätiologie der Erkrankungen und wegen der geringen Anzahl der untersuchten Patienten.

Auffällig war das veränderte Verhältnis von THF : THE bei den Patientinnen 3 und 4, denn es war mit 1 : 0,6 (Pat.Nr.3) beziehungsweise 1 : 0,8 (Pat.4) stark zu Gunsten von THF verschoben. Die weitaus niedrigste Hormonausscheidung hatte Patientin 2, die aber unter dem Einfluß einer Dexamethasonmedikation (3 x 0,5 mg/Tag) stand.

Die Hormonanalysen bei Patienten mit endokrinen Erkrankungen ergaben nur bei der Patientin 1 mit einem Cushing Syndrom und bei der Pat.2 mit dem Adrenogenitalen Syndrom, eine im Vergleich zu Normalpersonen veränderte Hormonausscheidung. Bei der Patientin mit dem Cushing Syndrom war besonders die Ausscheidung von unverestertem Cortisol mit 265 µg pro Tag deutlich erhöht. Bei der Patientin mit dem Adreno-Genitalen Syndrom war die Ausscheidung aller untersuchten Steroide im Vergleich zu Normalpersonen deutlich vermindert. Das Verhältnis der einzelnen Steroide zueinander war bei beiden unauffällig.

Tabelle 5:

Ergebnisse der Hormonanalysen bei NORMALPERSONEN						unverest. 17-OHCS	Cortisol	Cortison	veresterte 17-OHCS	THF	Allo- THF	THE
Nr	Name	Alter Geschl.	Größe	Gewicht	Urin ml/Tag	µg / Tag			mg / Tag			
1	K. M.	32m	-	-	118o	48o	49	39	5,3	1,5	-	3,1
2	R. L.	24m	-	-	83o	415	45	46	7,4	2,1	-	4,7
3	H. B.	16w	-	-	68o	51o	4o	49	6,o	1,6	o,8	2,o
4	E. U.	27w	-	-	115o	375	46	43	5,5	1,1	1,o	2,2
5	A. R.	51w	-	-	84o	42o	33	4o	5,9	2,o	1,2	2,6
6	M. W.	3ow	-	-	98o	365	51	62	9,2	1,6	1,4	4,4
7	J. S.	23m	-	-	83o	52o	66	37	6,9	1,5	1,o	2,8
8	O. T.	25m	-	-	98o	44o	43	36	1o,2	2,1	o,4	5,3
9	M. K.	71w	-	-	61o	46o	38	43	1,9	o,6	o,4	1,1
1o	O. B.	49w	-	-	91o	545	47	25	3,9	o,9	o,5	1,5
11	L. H.	36w	-	-	84o	465	45	26	4,7	1,5	o,5	2,3
12	E. B.	25w	-	-	54o	-	26	27	-	1,7	o,5	2,1
13	M. D.	38w	-	-	56o	53o	52	55	4,o	o,8	o,4	1,9
14	C. M.	17w	-	-	1o2o	-	-	-	-	2,8	-	3,8
15	M. F.	24w	-	-	975	-	-	-	2,5	o,8	o,3	1,2
Statistische Auswertung												
1. Streubereich						365 - 545	26 - 66	25 - 62	1,9 -1o,2	o,6 - 2,8	o,3 -1,4	1,1 -5,3
2. Arithmetisches Mittel $\bar{X}$						46o,4	44,7	4o,6	5,65	1,51	o,61	2,73
3. Standardabweichung s						59,6	9,7	11,o	2,39	o,62	o,45	1,29
4. Streuung s^2						3547	93,7	121,8	5,72	o,37	o,2o	1,66
5. Normalbereich $\bar{X} \pm 2s$						46o,4 119,2	44,7 +19,4	4o,6+ 22	5,65+4,78	1,51+1,24	o,61 +o,9	2,73 +2,58

Tabelle 6:

Ergebnisse der Hormonanalysen bei FETTSÜCHTIGEN						unverest. 17- OHCS	Cortisol	Cortison	Veresterte 17-OHCS	THF	Allo-THF	THE
Nr.	Name	Alter Geschl	Größe cm	Gewicht kg	Urin ml/ Tag	µg / Tag			mg / Tag			
1	K. R.	5o w	17o	118	49o	355	21	5o	8,4	1,5	1,1	6,9
2	H. K.	18 w	165	74	9oo	37o	57	27	9,2	2,5	o,4	6,7
3	F. B.	3o w	164	13o	69o	38o	65	51	1o,2	3,8	1,o	6,8
4	C. K.	18 w	178	95	11oo	71o	13o	159*	13,o	4,o	o,6	9,8
5	I. S.	2o w	168	72	74o	59o	137	53	8,7	2,o	o,9	7,6
6	M. M.	13 w	148	71	7oo	315	64	46	8,1	1,8	o,7	5,3
7	E. K.	26 w	157	79	37o	35o	58	45	7,o	1,3	o,7	4,3
8	S. S.	34 w	165	1o5	41o	-	1oo	3o	-	2,o	o,6	4,o
9	H. R.	16 w	172	81	38o	-	-	-	-	1,6	-	4,6
1o	K. R.	17 m	185	149	96o	55o	46	18	15,o	3,o	1,8*	11,1
Statistische Auswertung												
1. Streubereich						315 - 71o	21 - 137	18-159	7,o -15,o	1,3 -4,o	o,4 - 1,8	4,o - 11,1
2. Arithmetisches Mittel $\bar{X}$						452,5	75,3	4o,o	9,95	2,35	o,75	6,71
3. Standardabweichung s						144	38,9	17,o	2,71	o,95	o,23	2,29
4. Streuung s^2						2o814	1514	287	7,36	o,91	o,54	5,23
5. Normalbereich $\bar{X} \pm 2s$						452,5 288	75,3 77,8	4o,o+ 34	9,95 +5,42	2,35 + 1,9	o,75+ o,46	6,71 +4,58

* erfüllten das CHAUVENETsche Kriterium und wurden deshalb bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt !

Tabelle 7:

Ergebnisse der Hormonanalysen nach ACTH					unverest. 17-OHCS	Cortisol	Cortison	veresterte 17-OHCS	THF	Allo-THF	THE
Nr.	Name	Alter Geschl.	klin.Diagnose	Urin ml/ Tag	µg/ Tag			mg / Tag			
1	I.H.	-	NNR-überfunkt.	6oo	-	8oo	-	-	14,2	3,o	16,8
2	E. K.	26 w	Adipositas	58o	79o	653	13o	27,o	4,9	1,o	22,3
3	K. R.	17 m	Adipositas	11oo	88o	37o	42	33,o	11,6	4,5	16,o

Tabelle 8:

Ergebnisse der Hormonanalysen nach einem 24- stündigen Nahrungsentzug					unverest. 17- OHCS	Cortisol	Cortison	veresterte 17- OHCS	THF	Allo-THF	THE
Nr.	Name	Alter Geschl.	klin.Diagnose	Urin ml/ Tag	µg / Tag			mg / Tag			
1	E. B.	25 w	Normalperson	43o	42o	49	67	5,6	1,9	o,5	2,7
2	K. R.	5o w	Adipositas	124o	87o	52	63	12,6	1,5	1,o	8,2
3	E. K.	26 w	Adipositas a.	145	-	75	5	-	o,6	o,3	1,5
			b.	155	-	32o	1	-	1,1	o,4	2,7
			a +b	3oo	-	395	6	-	1,7	o,7	4,2
Urin 2 mal 12 Stunden gesammelt !											

Tabelle 9 :

Ergebnisse der Hormonanalysen bei NIERENKRANKEN					unverest. 17-OHCS	Cortisol	Cortison	veresterte 17-OHCS	THF	Allo- THF	THE
Nr.	Name	Alter Geschl.	klin.Diagnose	Urin ml/Tag	µg /Tag			mg / Tag			
1	I. P.	21 w	chron.Nephrit.	88o	11o	25	6	2,2	o,8	o,3	1,3
2	J. V.	62 w	Nephrot.Syndr.	58o	26o	8	5	o,5	o,1	-	o,3
				19o	-	-	-	o,5	o,1	o,o8	o,2
3	J. Z.	m	Nephrot.Syndr.	152o	65o	114	42	3,8	o,7	o,5	o,4
4	M. L.	w	Kimmelst.Wils.	47o	14o	-	-	3,4	o,9	o,2	o,7
5	S. S.	24 w	Zust.n.Pyeliti	134o	-	-	-	o,5	o,2	-	o,4

Tabelle 1o :

Ergebnisse der Hormonanalysen bei Patienten mit endokrinen Erkrankungen					unverest. 17- OHCS	Cortisol	Cortison	veresterte 17- OHCS	THF	Allo- THF	THE
Nr.	Name	Alter Geschl.	klin.Diagnose	Urin ml/ Tag	µg / Tag			mg / Tag			
1	I. P.	17 w	Cushing Syndr.	13oo	unbrauchb.	265	88	unbrauchb.	6,4	1,6	1o,9
2	F. H.	w	Adreno-Genit S.	13o	18o	17	8	1,3	o,3	-	o,7
3	I. H.	-	NNR-Überfunkt.	5oo	-	69	-	6,5	1,6	1,2	3,6
4	M. G.	24 w	Akromegalie	94o	76o	52	83	6,6	2,o	o,3	4,o
5	M.	w	Diabet. Mell.	1o8o	-	69	38	11,o	2,3	1,9	6,o
6	L. R.	51 m	Diabet. mell.	11oo	-	-	-	8,2	2,3	o,4	5,o
7	G. S.	m	Diabet. insip.	48oo	72o	29	21	2,3	o,9	o,2	1,o

IV. S T A T I S T I K

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse dienten:

1. Arithmetisches Mittel	$\bar{x}$
2. Streuung	s
3. Standardabweichung	s^2
4. Normalbereich	$\bar{x} \pm 2s$
5. Korrelationskoeffizient	r
6. Bestimmtheitsmaß	r^2
7. Prüfung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte	
8. Prüfung der Signifikanz eines Regressions- oder Korrelations-koeffizienten	
9. CHAUVENET'S KRITERIUM zum Ausschluß von Extremwerten, die die Mittelwerte falsch beeinflussen.	

Sämtliche Formeln für die Ableitung obiger Begriffe wurden den WISSENSCHAFTLICHEN TABELLEN der Fa. GEIGY - Jahrgang 1955 entnommen.

D I S K U S S I O N

I. KRITIK DER METHODE

Allgemeines

Zur Spaltung der im Urin ausgeschiedenen Glukuronsäureester der Cortisolabbauprodukte dient die ß-Glukuronidase. Der Nachteil einer fermentativen Aufspaltung der Glukuronsäureester liegt darin, daß die mit Schwefelsäure veresterten Steroide nicht erfaßt werden und daß verschiedene, in jedem Urin vorkommende Substanzen die Aktivität der ß-Glukuronidase beeinflussen (90, 91)

Die nach Verabreichung von Acetylsalicylsäure im Urin erscheinenden Salicylatglukuronide (92) hemmen ebenso wie Lactone und Alkohole die Aktivität dieses Enzyms (93) und beeinflussen somit die Ergebnisse der Hormonanalysen.

Bei unseren Versuchen hatte das Erhitzen der Urine vor der Hydrolyse zur Zerstörung proteolytischer Fermente keinen signifikanten Einfluß auf die Ergebnisse der Hormonuntersuchungen.

Bebrütet wurde bei einem pH von 4,6, denn die Untersuchungen von VOIGT (94) haben gezeigt, daß diese Wasserstoffionenkonzentration für die Aktivität der ß-Glukuronidase optimal ist.

Dauer und Temperatur der Bebrütung erfolgte nach den Angaben von GLENN und NELSON (95).

Den Einfluß der ß-Glukuronidasekonzentration auf die Spaltung von Glukuronsäureestern zeigt die Abbildung 10.

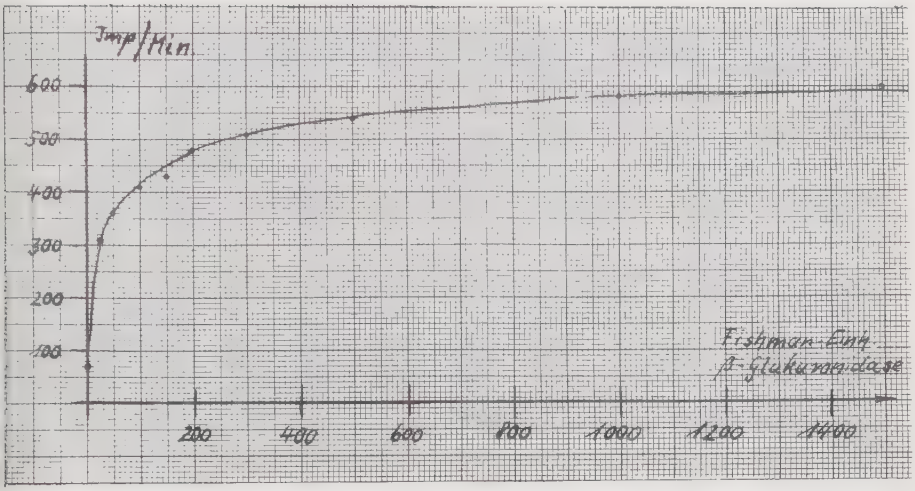


Abbildung 10: Einfluß der ß-Glukuronidase-konzentration auf die Spaltung von Glukuronsäureestern.

Mit steigender ß-Glukuronidasekonzentration wurden jeweils 3 ml Urin einer Patientin, der zur Bestimmung der Cortisolsekretionsrate 0,1 µC Cortisol -4- C-14 injiziert worden war, 15 Stunden bei einer Temperatur von 47 Grad Celsius bebrütet und die Radioaktivität des Chloroformextraktes mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard) gemessen.

Unter diesen Versuchsbedingungen ist die Anzahl der Impulse pro Minute direkt proportional den fermentativ gespaltenen Cortisolmetaboliten.

Die Kurve, die den Zusammenhang zwischen der ß-Glukuronidasekonzentration und den gemessenen Impulsen pro Minute zeigt, geht nicht durch den Nullpunkt des Koordinatensystems, denn der Urinleerwert, das heißt, der Chloroformextrakt aus unbebrütetem Urin, ergibt ebenfalls eine gewisse Anzahl von Impulsen, die durch unverestertes Cortisol und unveresterte Cortisolmetaboliten bedingt sind.

Bereits bei einer ß-Glukuronidasekonzentration von 25 Fishman Einheiten pro ml Urin entsprach die Anzahl der Impulse etwa 50 % der Impulse, die nach Bebrütung mit 1000 Fishman Einheiten erhalten wurden.

Für qualitative Untersuchungen, bei denen große Urinmengen verarbeitet werden, genügt es deshalb, mit geringer Fermentkonzentration zu bebrüten (25 bis 100 Fishman Einheiten).

Für quantitative Untersuchungen, bei denen die ausgeschiedenen Absolutmengen der Steroide bestimmt werden sollen, ist es notwendig, eine hohe ß-Glukuronidasekonzentration anzuwenden.

Da eine Erhöhung der Fermentkonzentration über 1000 Fishman Einheiten die Ergebnisse nicht über den Rahmen der Fehlerbreite der Methode beeinflußte, wurden die Urine mit einer Fermentkonzentration von 1000 Fishman Einheiten pro ml Urin bebrütet.

- - -

Von JOHNSON (96) wurde eine Methode angegeben, mit der es unter Verwendung einer Silicagelsäule gelingt, Steroide aus dem Urin aufzutrennen. Da diese Methode jedoch umständlich und schwer reproduzierbar ist, wurde die Silicagelsäule nur zu einer Reinigung der Chloroformextrakte angewandt.

In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse orientierender Untersuchungen über die bei der Säulenchromatographie auftretenden Verluste zusammengestellt.

Die bei der säulenchromatographischen Reinigung beschriebene Versuchsanordnung wurde bei der Erprobung der Silicagelsäule in allen Einzelheiten beibehalten.

Zusätzlich wurde noch mit 50 ml 10 % Methanol-Chloroform (= Fraktion III) eluiert.

Die Probeversuche wurden mit folgenden Testsubstanzen durchgeführt:

1. Cortisol - 4-C-14: spezifische Aktivität
   7,83 mC / mMol
   Versuch 1 und 2 mit je 0,115 µg
   Versuch 3 und 4 mit je 0,230 µg

2. Cortison Versuch 1 und 2 mit je 20 µg

3. Tetrahydrocortison Versuch 1 und 2 mit je 10 µg
   Versuch 3 und 4 mit je 20 µg

HORMON		% der auf die Säule gegebenen Hormonmenge			
		FRAKTION I $CHCl_3$ p.A.	FRAKTION II 5% CH_3OH	FRAKTION III 10% CH_3OH	Faktion I+II+III
CORTISOL	1	12,7	89,1	7,2	109,0
	2	4,2	92,9	7,1	102,2
	3	2,1	84,3	4,0	90,4
	4	6,0	77,5	4,6	88,1
	$\bar{x}$	6,2	85,9	5,7	97,4
CORTISON	1	7,3	86,8	3,2	97,3
	2	15,3	84,3	6,6	106,2
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	$\bar{x}$	11,3	85,5	4,9	101,7
THE	1	3,1	63,5	12,3	78,9
	2	13,1	68,6	7,3	106,2
	3	4,7	87,4	8,3	100,4
	4	2,4	92,5	3,8	98,7
	$\bar{x}$	5,8	78,0	7,9	97,0

Tabelle 11: Ergebnisse der Erprobung der Silicagelsäule.

Bei der Elution der auf die Säule gebrachten Hormone mit 50 ml 5 % Methanol in Chloroform ergab sich für Cortisol ein Verlust von im Mittel 14,1 % (7,1 - 22,5), für Cortison im Mittel 14,5 % (13,2 - 15,7) und für THE im Mittel 22,0% (7,5 - 36,5).

Da der Verlust von THE bei der Säulenchromatographie bis 36,5 % betrug, wurde auf eine säulenchromatographische Reinigung des nach fermentativer Spaltung der Glukuronsäureester gewonnenen Chloroformextraktes verzichtet.

Bei der Papierchromatographie von Reinsubstanzen (2 x 0,115 µg Cortisol - 4 - C'-14- (spez.Akt. 7,83 mC/mMol) und 2 x 20 µg Tetrahydrocortison) im System BUSH B-5 ergab sich nach der Elution ein Verlust von 0 bis 11,2 %, im Mittel von 4,9 %.

- - -

PORTER und SILBER (12) verwandten zum ersten Mal Phenylhydrazin - Schwefelsäure zur colorimetrischen Bestimmung von Nebennierenrindenhormonen. Diese Reaktion setzt eine Dihydroxyacetonseitenkette voraus.

Cortisol, Cortison, Reichstein's Substanz S, sowie sämtliche Tetrahydroverbindungen dieser Steroide mit erhaltener Seitenkette erfüllen diese Bedingung.

Die Hexahydroverbindungen von Cortisol und Cortison (Cortole und Cortolone), bei denen auch die Seitenkette am C-Atom 17 reduziert ist, können ebenso wie Corticosteron mit dieser Reaktion nicht quantitativ erfaßt werden.

Es ist bekannt, daß gleiche Mengen verschiedener Steroide die mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure reagieren, unter gleichen Versuchsbedingungen keine übereinstimmenden Extinktionen ergeben (12, 97).

Bezogen auf die Extinktion von Cortisol (= 100 %) hatten die einzelnen Steroide folgende Extinktionen:

Cortison	110 %
THF	60 %
THE	115 %

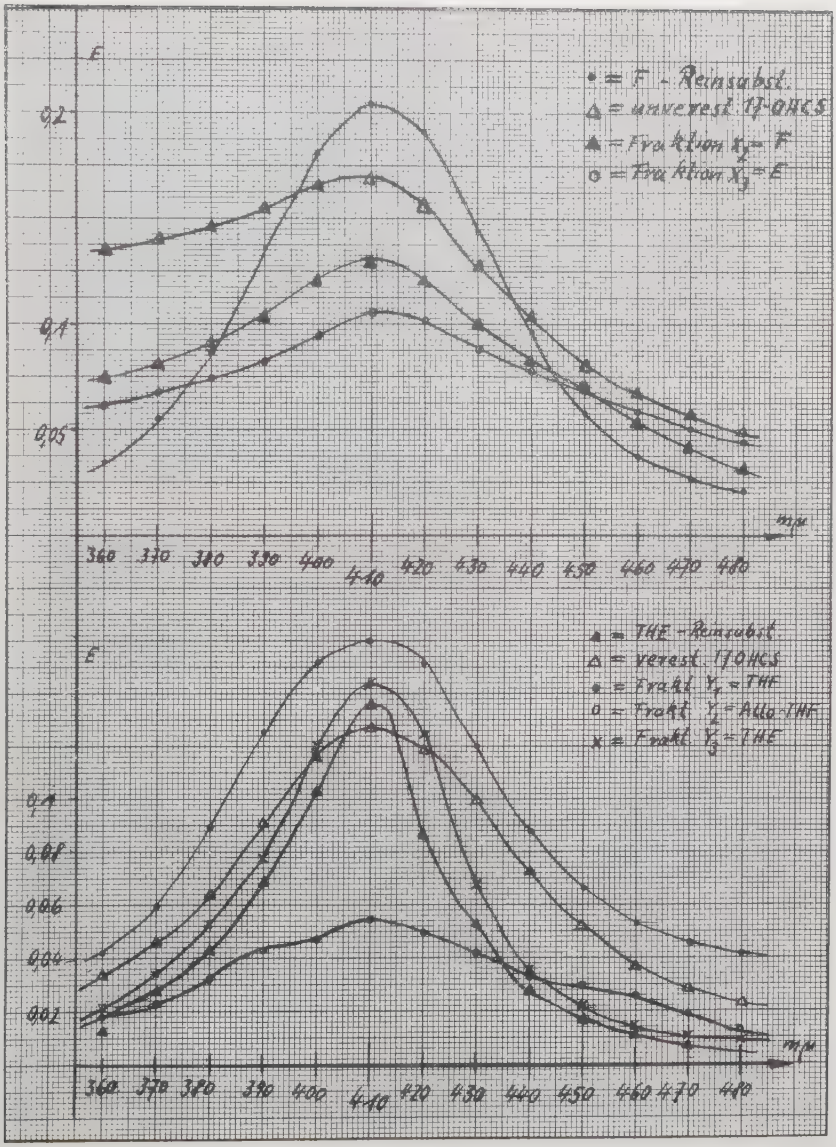


Abbildung 11: Extinktionskurven der Reinsubstanzen und der aus dem Urin isolierten Steroide nach Reaktion mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure

Auf die von verschiedenen Autoren (97) vorgeschlagene Farbentwicklung bei 25 Grad Celsius für die Dauer von 16 Stunden wurde verzichtet.

Die mit je 10 Gamma Cortisol durchgeführten 4 Probeuntersuchungen lieferten unter diesen Bedingungen um durchschnittlich 15,2 % höhere Extinktionen (14,9 - 15,6 %)

Spezifität:

Die Spezifität der Reaktion mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure wurde durch die Bestimmung der Extinktionskurven im Bereich von 360 bis 480 mμ untersucht.

Die Farbkomplexe, die bei der Umsetzung der Reinsubstanzen (Cortisol, Cortison, THF und THE) mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure entstehen, haben bei einer Wellenlänge von 410 mμ ein Extinktionsmaximum.

Diejenigen Farbkomplexe, die bei der Bestimmung der unveresterten und der mit Glukuronsäure veresterten 17-OHCS, sowie bei der quantitativen Auswertung der einzelnen Zonen entstehen, haben im selben Wellenbereich ihr Extinktionsmaximum.

Zur Verbesserung der Spezifität der Farbreaktion mit Phenylhydrazin-Schwefelsäure wurde von SILBER (86) folgende Formel angegeben:

$$\text{korr.opt.Dichte} = 2 \times \text{Ext.}_{410\,m\mu} \quad (\text{Ext.}_{380\,m\mu} + \text{Ext.}_{440\,m\mu})$$

Aus Abbildung 12 und dem Rechenbeispiel ist ersichtlich, daß eine vorurteilslose Anwendung dieser Formel bei einem steilen Anstieg der Extinktionskurve ebenfalls zu Fehlergebnissen führt.

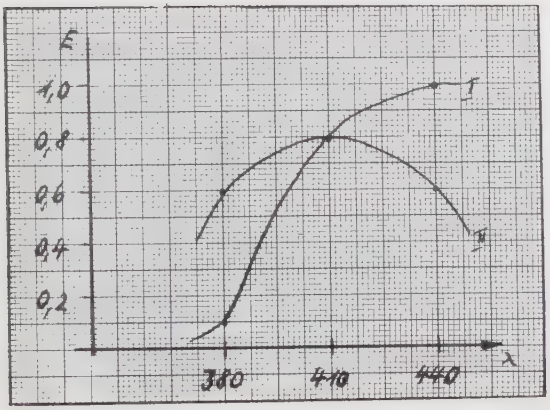


Abbildung 12 :

Rechenbeispiel:

I. $E_{korr.} = 2 \times 0,8 - (0,1 + 1,0) = 0,5$

II. $E_{korr.} = 2 \times 0,8 - (0,6 + 0,6) = 0,4$

Trotzdem Kurve II wesentlich spezifischer als Kurve I ist, denn sie hat bei 410 mu ein Maximum , ist ihre nach der obigen Formel korrigierte optische Dichte nur 80 % der für Kurve I errechneten optischen Dichte!

II. DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE

Die bei Normalpersonen erhaltenen Werte für die tägliche Ausscheidung von unveresterten und veresterten 17-OHCS, sowie von Cortisol, Cortison, THF, Allo-THF und THE stimmen ebenso wie das gegenseitige Verhältnis der einzelnen Nebennierenrindensteroide zueinander gut mit den Angaben aus der Literatur (19-27, 97, 98, 99) überein. Wegen der verhältnismäßig geringen Anzahl der untersuchten Normalpersonen wurde auf eine Unterteilung der Untersuchungsergebnisse nach Alter und Geschlecht der Untersuchungspersonen verzichtet.

Im Gegensatz zu WALSER (100), der keine Abhängigkeit der täglichen Ausscheidung der 17-OHCS vom Alter feststellen konnte, fand BORTH (101) mit steigendem Alter eine verminderte Ausscheidung dieser Hormone. ROMANOFF (20) fand ebenfalls bei jungen Männern im Alter von 18 - 35 Jahren im Vergleich zu älteren Männern, sowie zu Frauen aller Altersstufen, eine signifikant höhere Ausscheidung von THF, Allo-THF und THE.

Die Ergebnisse der Hormonanalysen bei Fettsüchtigen sind in den Abbildungen 13 und 14 graphisch dargestellt.

Die Ausscheidung von unveresterten 17-OHCS, sowie von Cortison und Allo-THF stimmt weitgehend mit den bei Normalpersonen gefundenen Werten überein.

Im Gegensatz dazu wurde Cortisol ($0{,}02 > P > 0{,}01$), sowie THF ($0{,}02 > P > 0{,}01$) und THE ($P > 0{,}001$) und auch die veresterten 17-OHCS ($0{,}01 > P > 0{,}001$) von den Fettsüchtigen im Mittel signifikant vermehrt ausgeschieden.

Inwieweit sprechen diese Versuchsergebnisse für eine bei Fettsüchtigen gesteigerte Nebennierenrindenfunktion, für die bereits SZENAS und PATTEE (102) durch Bestimmung der 17-Hydroxycorticosteroide im Urin Anhaltspunkte fanden ?

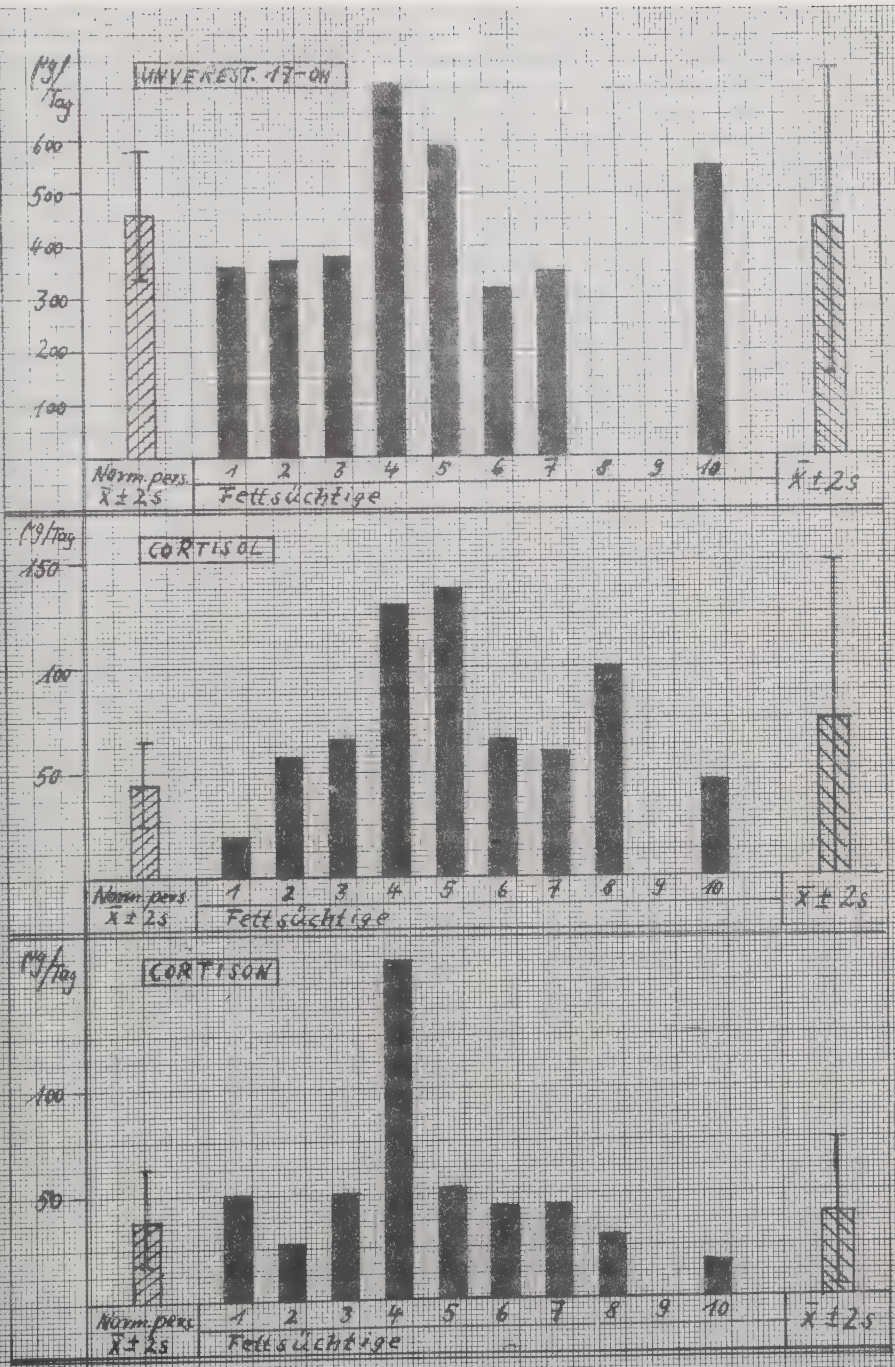


Abbildung 13 : Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Fettsüchtigen – unveresterte 17-OHCS , Cortisol und Cortison.

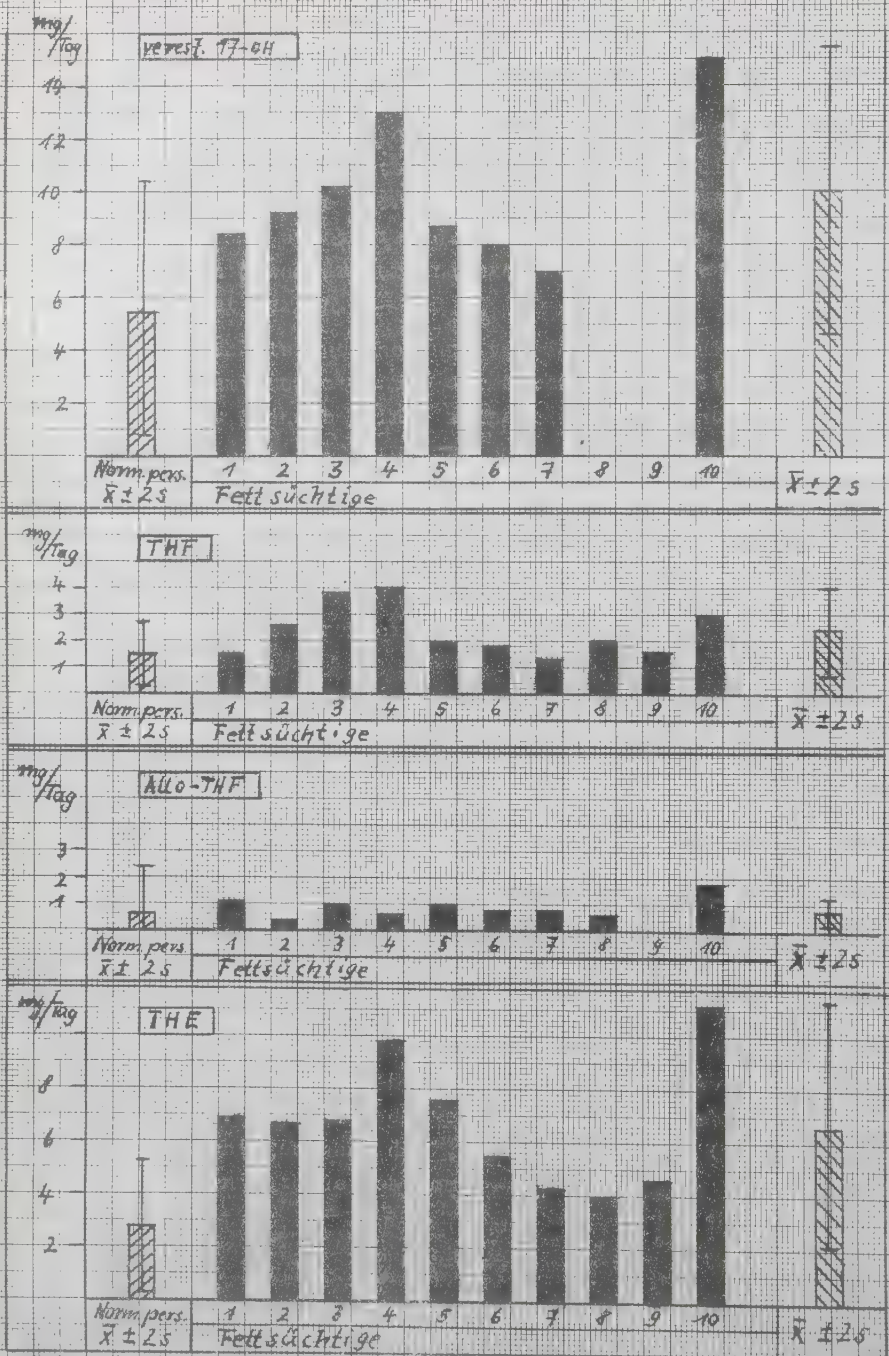


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Fettsüchtigen - verestertes 17-OHCS, THF, Allo-THF und THE

Eine vermehrte Ausscheidung von THF oder THE kann sowohl durch eine vermehrte Cortisolsekretion bedingt sein, als auch durch eine Störung der Reduktion der Seitenkette am C-Atom 17, durch die THF und THE teilweise zu den entsprechenden Hexahydroverbindungen, den Cortolen und Cortolonen abgebaut werden.

Eine erhöhte Ausscheidung von THF, Allo-THF und THE, die insgesamt nur etwa 50% der Cortisolmetaboliten ausmachen, erlaubt deshalb keinen zwingenden Schluß auf eine vermehrte Cortisolsekretion.

Die signifikant erhöhte Ausscheidung von unverestertem Cortisol, die nach den Untersuchungen von COPE und BLACK (103) am sichersten auf eine Nebennierenrindenüberfunktion schließen läßt, spricht dafür, daß die vermehrte Ausscheidung von THF und THE durch eine Cortisolmehrproduktion bedingt ist.

Grundsätzlich gelten zur Beurteilung einer erhöhten Ausscheidung von Cortisol dieselben Überlegungen wie für die Cortisolmetaboliten, denn eine vermehrte Ausscheidung dieses Hormons kann ebenfalls neben einer vermehrten Produktion, auch durch einen gestörten Abbau bedingt sein. Zusätzlich kommt bei der Ausscheidung von Cortisol noch hinzu, daß die erhöhte Ausscheidung dieses Steroids auch durch eine Störung des von SCHEDL (104) für dieses Hormon postulierten tubulären Rückresorptionsmechanismus bedingt sein kann.

Zur endgültigen Klärung der Frage, ob bei den Fettsüchtigen eine vermehrte Sekretion von Cortisol vorliegt, wurde die Sekretionsrate dieses Hormons bei Normalpersonen und Fettsüchtigen nach der von KARL und RAITH (105) ausgearbeiteten Methode bestimmt.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Sekretionsraten von Cortisol bei Normalpersonen und Fettsüchtigen (KARL [illegible] RALTH (10a)) zeigten, daß die tägliche Cortisolproduktion bei den adipösen Patienten im Vergleich zu Normalgewichtigen leicht bis deutlich erhöht ist. Dadurch konnte bewiesen werden, daß die bei Fettsüchtigen vermehrte Ausscheidung von Cortisol, sowie von THF und THE durch eine gesteigerte Cortisolsekretion bedingt ist.

Zwischen dem Übergewicht in Prozent und der täglichen Ausscheidung von Cortisol oder einzelner der untersuchten Metaboliten konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden.

Wodurch das veränderte Verhältnis von THF zu THE, das bei den Fettsüchtigen im Vergleich zu Normalpersonen von im Mittel 1,8 signifikant auf 3,0 erhöht ist, kann nicht eruiert werden; Rückschlüsse auf einen veränderten Cortisolstoffwechsel sind deshalb nicht erlaubt.

Die verhältnismäßig stärker erhöhte Ausscheidung von THE im Vergleich zu THF entspricht nicht dem von DYRENFURTH (29) bei Patienten mit einem Cushing Syndrom oder von GOLD (21) bei Normalpersonen unter ACTH gefundenen Verhältnis mit einer relativen Vermehrung von THF.

- - -

Die Abbildung 15 zeigt den jeweiligen prozentualen Anstieg der unveresterten- und der veresterten 17-OHCS, sowie der

einzelnen untersuchten Steroide im 24-Stundenharn, nach einer 8-stündigen Dauertropfinfusion von 25 I.E. ACTH, gelöst in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung.

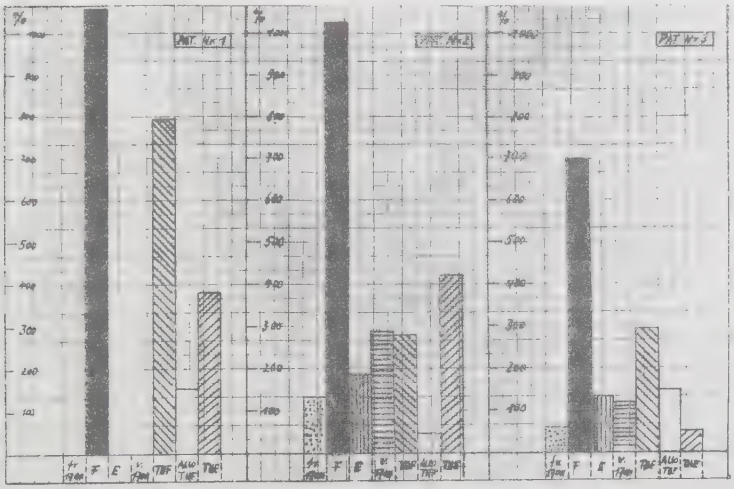


Abbildung 15: Prozentualer Anstieg der untersuchten Nebennierenrindenhormone im 24-Stunden-Urin nach ACTH

Im Vergleich zu den Ausgangswerten stiegen sowohl Cortisol und Cortison als auch die Tetrahydroverbindungen unter ACTH an.
Den weitaus stärksten Anstieg bei der ACTH-Stimulierung der Nebennierenrinde zeigte das unveresterte Cortisol, das im Vergleich zu den Ausgangswerten bis 1060 % vermehrt ausgeschieden wurde.

Das unter ACTH im Vergleich zu den Ausgangswerten veränderte Verhältnis von THF zu THE, das bei Patientin Nr.1 von 1 : 2,3 auf 1 : 1,2 und bei der Patientin Nr.3 von 1 : 3,7 auf 1 : 1,4 absank, stimmt gut mit den Angaben von GOLD (21) überein.

Eine Ausnahme bildete Patientin Nr.2, bei der das Verhältnis der beiden Metaboliten von 1 : 3,3 auf 1 : 4,6 zugunsten von THE verschoben war.

- - -

Es wurde ferner untersucht, ob und wie ein 24-stündiger Nahrungsentzug die Ausscheidung von Nebennierenrindenhormonen bei Normalgewichtigen und Fettsüchtigen beeinflußt.

Von allen Patientinnen wurden im Hunger, verglichen mit den Hormonausscheidungen bei "normaler" Ernährung, vermehrt Nebennierenrindensteroide ausgeschieden.

Die Abbildung 16 zeigt den prozentualen Anstieg der einzelnen Steroide im Urin, der während einer 24-stündigen Hungerperiode ausgeschieden wurde.

Bei der normalgewichtigen Vergleichsperson stieg sowohl Cortisol (88%) als auch Cortison (148%) im Hunger stark an. Die Ausscheidung der Tetrahydroverbindungen dagegen war nur wenig erhöht. (THF 12%, Allo-THF 0%, THE 29%)
Bei der adipösen Patientin (Nr.2) zeigte nur Cortisol einen starken Anstieg auf 148 %. Der Anstieg der Tetrahydroverbindungen entsprach weitgehend dem der Normalperson.

Der besonders starke Anstieg von unverestertem Cortisol in der 2.Hälfte der Hungerperiode bei Patienten Nr.3 könnte als überschießende Reaktion der Nebennierenrinde auf den

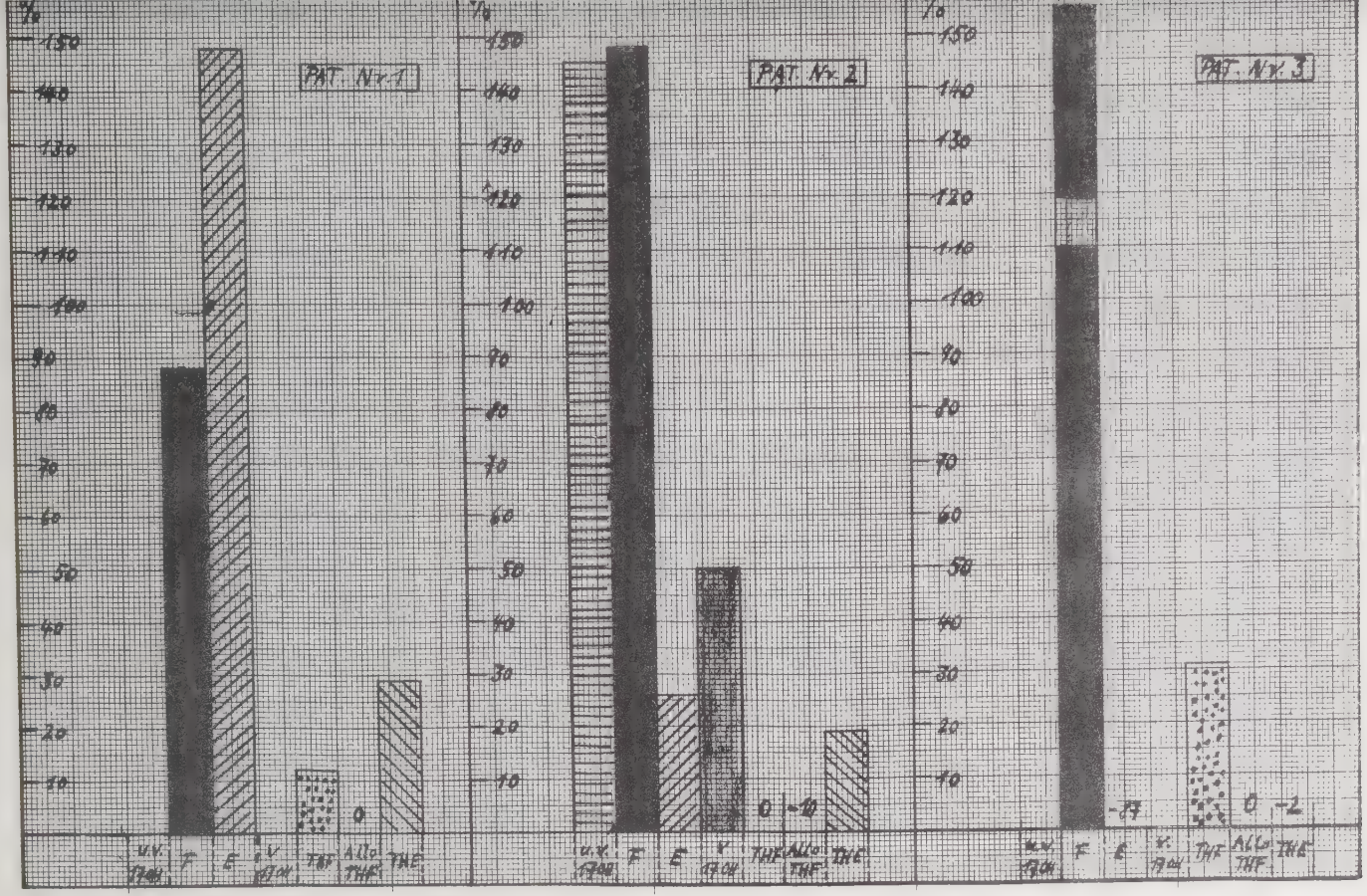


Abbildung 16: Prozentualer Anstieg der untersuchten Nebennierenrindenhormone im Urin während eines 24- stündigen Nahrungsentzugs.

langdauernden Nahrungsentzug gedeutet werden. Bei dieser Patientin war die sehr geringe Ausscheidung von Cortison (in der gesamten Tagesmenge nur etwa 6 µg nachweisbar, bei einem Verhältnis von F : E = 66 : 1) auffällig.
Das Verhältnis von THF zu THE war im Hunger mit einem Anstieg von 1 : 1,2 auf 1 : 1,4 (Pat.Nr.1) sowie von 1 : 4,6 auf 1 : 5,5 (Pat.Nr.2) zugunsten von THE gering verschoben.

Nur bei der Patientin Nr.3 fiel dieses Verhältnis von 1 : 3,3 auf 1 : 2,5 zugunsten von THF ab.

- - -

WEISSBECKER und RUPPEL (106) sowie WILLARDSEN (107) fanden bei Nierenkranken eine verminderte Ausscheidung von Corticoiden, beziehungsweise 17-Ketosteroiden im Urin und schlossen daraus auf eine Nebennierenrindenunterfunktion.

Die Untersuchungen von ENGLERT (108) und KARL (71) über die unveresterten und die mit Glukuronsäure veresterten 17-OHCS im Blut und Urin Nierenkranker sprachen jedoch nicht für eine herabgesetzte Nebennierenrindenfunktion bei diesen Patienten.

Bei unseren Untersuchungen waren im Vergleich zu Normalpersonen bei den Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion die Ausscheidung aller untersuchten Nebennierenrindensteroide an der unteren Grenze der Norm oder deutlich vermindert.

Durch die Bestimmung der Cortisolsekretionsrate bei der Patientin Nr.5, die mit 21,8 mg Cortisol pro Tag einen Wert ergab, der sogar etwas über dem für Normalpersonen gefundenen Bereich lag (11,3 - 20,7 mg pro Tag), konnte nachgewiesen werden, daß zum mindesten bei dieser Patientin die deutlich verminderte Ausscheidung von THF mit 0,19 mg und von THE mit 0,39 mg pro Tag nicht durch eine verminderte Cortisolsekretion verursacht ist.

Dieses Beispiel zeigt, daß eine vorurteilslose Interpretation der Hormonausscheidung bei Störungen der Nierenfunktion leicht zu einer falschen Beurteilung der Nebennierenrindenfunktion führen kann.

KARL (71) hat gezeigt, daß die Ausscheidung der veresterten 17-OHCS durch das Glomelusfiltrat beeinflußt wird.

Ob die geringe Ausscheidung von THF und THE bei der Patientin Nr.5 allein durch ihr auf 78 ml pro Minute erniedrigtes Glomerulusfiltrat (gemessen aus der endogenen Kreatininclearance) bedingt ist, ist jedoch zweifelhaft. Vielleicht ist für die geringe Ausscheidung der Cortisolmetaboliten auch eine Beeinträchtigung der Tubulusfunktion und eine daraus resultierende Störung des von DAUGHADAY (108) postulierten Sekretionsmechanismus für Steroidglukuronide mitverantwortlich. Über die Funktion des Tubulusapparates ist bei dieser Patientin jedoch nichts bekannt, denn entsprechende Clearanceuntersuchungen wurden nicht durchgeführt.

Die Diskrepanz zwischen der Ausscheidung von Tetrahydrometaboliten von Cortisol und der Cortisolsekretion ist nicht geklärt.

Inwieweit für das bei der Patientin Nr.3 und 4 im Vergleich zu Normalpersonen veränderte Verhältnis von THF : THE (1 : 0,6 und 1 : 0,8) zu Gunsten von THF eine Störung des Um- oder / und Abbaus dieser Metaboliten verantwortlich ist, kann nur die Untersuchung dieser Steroide im Blut klären.

- - -

Die Versuchsergebnisse bei der Patientin mit dem Cushing Syndrom (Tabelle 10 Pat.Nr.1), die später wegen einer doppelseitigen Nebennierenrindenhyperplasie total adrenalektomiert wurde, entsprechen in Bezug auf Quantität und Verhältnis der einzelnen Steroide zueinander, den Angaben in der Literatur (19, 26, 29).

Nr.	DATUM	unver. 17-OH	F	E	verest. 17-OH	THF	ATHF	THE
		ug / Tag			mg / Tag			
1	16.12. 1960	unbr.	265	88	unbr.	6,4	1,6	10,9
2	12.1. 1961	580	62	39	11,1	2,4	0,9	7,4
3	28.2. 1961	-	102	-	6,0	1,5	0,3	3,7

Tabelle 12: Ergebnisse der im Abstand von etwa 4 und 6 Wochen wiederholten Hormonanalysen bei einer Patientin mit einem Cushing Syndrom.

Die im Abstand von 4 und 6 Wochen wiederholte Bestimmung der Cortisolmetaboliten (Tabelle 12) zeigt, daß die tägliche Ausscheidung dieser Steroide starken Schwankungen unterliegt.

Eine einmalige Untersuchung der Hormonausscheidung kann also leicht zu falschen Rückschlüssen führen.

Es wird angenommen (30-33), daß beim angeborenen Adreno-Genitalen Syndrom (AGS) eine Synthesestörung von Cortisol vorliegt, die zur Bildung von Reichstein's Substanz S, das vorwiegend zu Tetrahydro S abgebaut wird, führt.

Bei der untersuchten Patientin (Tabelle 10 - Pat.Nr.2) mit einem angeborenen AGS spricht die verminderte Ausscheidung aller untersuchten Steroide für eine verminderte Cortisolsekretion, denn eine eingeschränkte Nierenfunktion bestand bei der Patientin nicht.

Über die Ursache der verminderten Hormonausscheidung oder Zusammenhänge mit einer eventuellen Cortisolsynthesestörung kann aus diesen Untersuchungsergebnissen nichts ausgesagt werden.

Bei den restlichen untersuchten Patienten mit endokrinen Erkrankungen konnte mit der angewandten Methode keine deutliche Abweichung des Steroidspektrums im Urin, im Vergleich zu Normalpersonen nachgewiesen werden.

- - -

Zusammenhang zwischen der Ausscheidung einzelner Nebennierenrindenhormone und den unveresterten und den mit Glukuronsäure veresterten 17- Hydroxycorticosteroiden:

Die Beziehung zwischen der Ausscheidung von Cortisol und den unveresterten 17- Hydroxycorticosteroiden im Urin zeigt die Abbildung 17

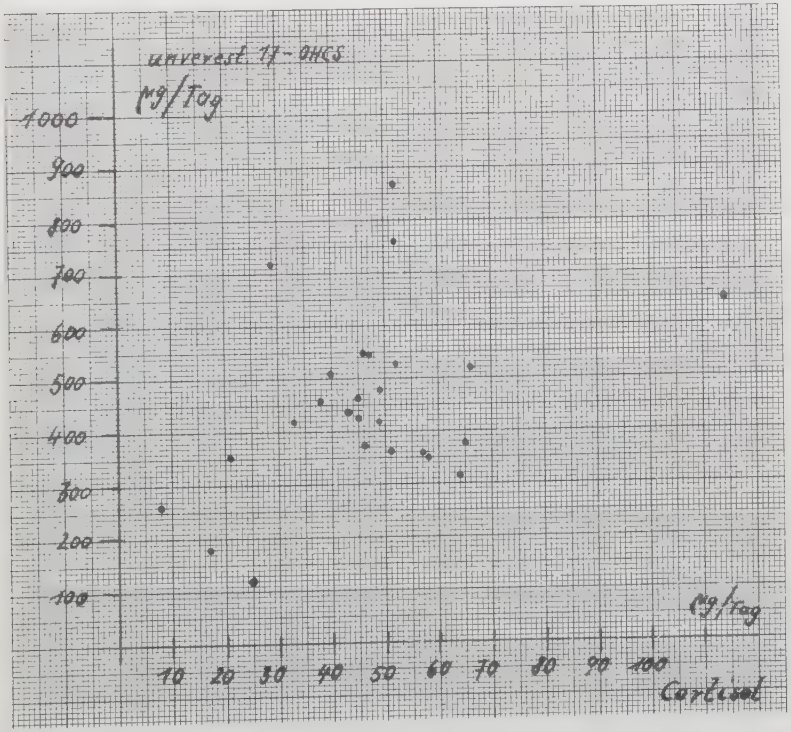


Abbildung 17: Beziehung zwischen der Ausscheidung von Cortisol und den unveresterten 17- Hydroxycorticosteroiden im Urin.

Der Anteil von Cortisol an den unveresterten 17-OHCS schwankte zwischen 3 und 82 %. Der Mittelwert, berechnet aus a l l e n Wertepaaren (Cortisol - unveresterte 17-OHCS) war 15,2 %. Dieser Mittelwert wird jedoch durch den hohen prozentualen Anteil von Cortisol an den unveresterten 17-OHCS bei den Patientinnen unter ACTH (Tabelle 7) verfälscht. Bei diesen war Cortisol mit 82% (Pat.Nr.2) bzw. 42% (Pat.Nr.3) an den unveresterten 17-OHCS beteiligt. Bei allen übrigen Untersuchungen war der Anteil von Cortisol an den unveresterten 17-OHCS maximal 23%, im Mittel 11,8%.

Die statistische Auswertung (ohne die beiden Patientinnen nach ACTH) ergab zwischen der Ausscheidung von Cortisol und der Bestimmung der unveresterten 17-OHCS eine K O R R E - L A T I O N . Der Korrelationskoeffizient war mit einem P von $0{,}01 > P > 0{,}001$ signifikant! Daraus folgt, daß durch die Bestimmung von Cortisol im Urin die Aussagemöglichkeiten über die Funktion der Nebennierenrinde, die die alleinige Bestimmung der unveresterten 17-OHCS erlaubt, wenigstens bis zu einer täglichen Cortisolausscheidung von 137 µg, nicht erweitert werden können.

Ob diese Zusammenhänge auch unter einer ACTH-Stimulierung der Nebennierenrinde Gültigkeit besitzen, bei der offensichtlich Cortisol im Vergleich zu den unveresterten 17-OHCS prozentual wesentlich stärker ansteigt, kann nur durch eine größere Versuchsreihe und deren statistische Auswertung geklärt werden.

Bei einer Blockierung der Cortisolsynthese (endogen beim angeborenen Adreno-genitalen Syndrom - exogen z.B. durch SU 4385), die zur Ausscheidung von Reichstein's Substanz S (PORTER, SILBER positiv!) führt (109), ist aus den Ergebnissen der Bestimmung der unveresterten 17-OHCS im Urin kein Rückschluß auf die Cortisolausscheidung möglich.

- - -

Die Abbildungen 18 zeigt den Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von THF und THE, sowie der Summe aus THF + Allo-THF + THE und den veresterten 17-OHCS.

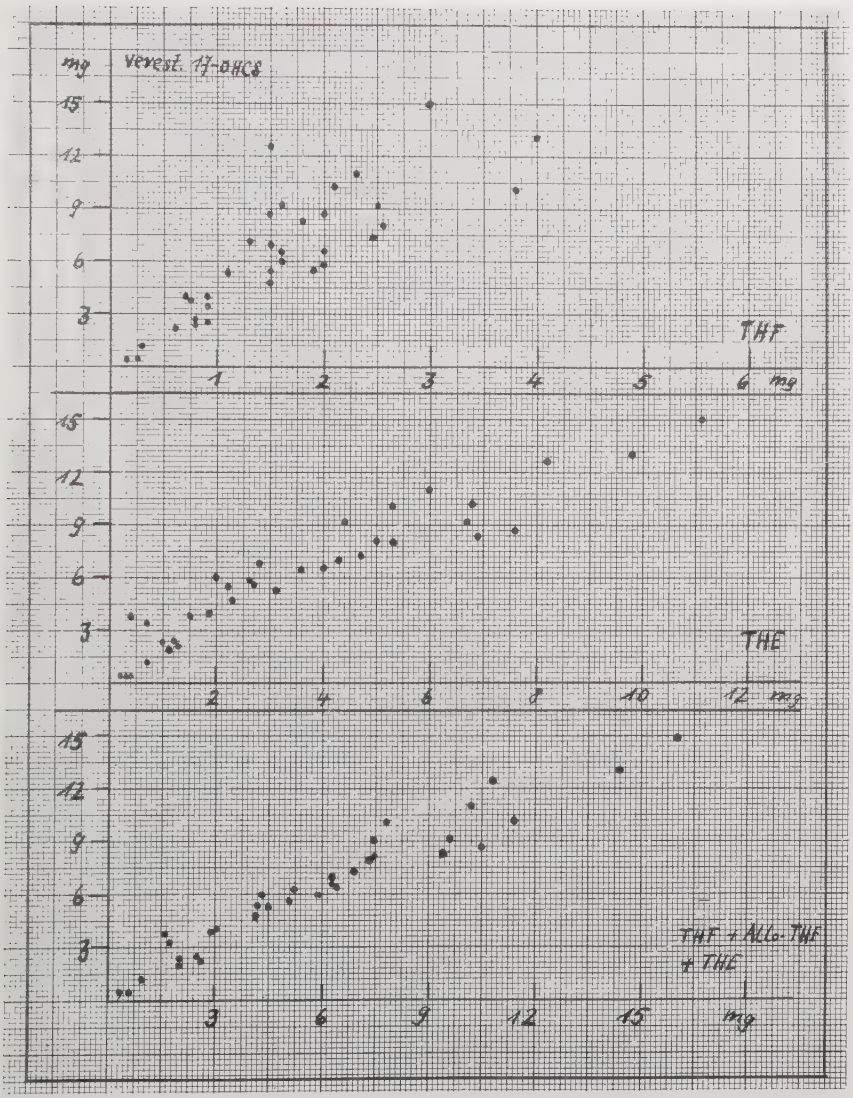


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen der Ausscheidung von THF und THE, sowie der Summe aus THF + Allo-THF + THE und den veresterten 17-OHCS.

Nr.	THF	ATHF	THE	THF + ATHF+THE	THF	ATHF	THE
	% d.verest. 17-OHCS				% d.Summen aus: THF + Allo-THF + THE		
1	28	-	58	86	33	-	67
2	30	-	64	94	32	-	68
3	27	13	33	73	37	18	45
4	20	18	40	78	26	23	51
5	34	20	44	98	34	21	45
6	17	15	48	80	22	19	59
7	22	15	41	78	28	19	53
8	20	(4)	52	76	27	5	68
9	32	21	58	111	29	19	52
10	23	13	39	75	31	17	52
11	32	11	49	92	35	12	53
12	-	-	-	-	39	12	49
13	20	10	48	78	26	13	61
14	-	-	-	-	47	-	53
15	32	12	48	92	35	13	52
16	18	13	82	113	16	12	72
17	27	4	73	104	26	4	70
18	37	10	67	114	33	9	58
19	31	5	75	111	28	4	68
20	23	10	87	110	19	9	72
21	22	9	65	96	23	9	68
22	19	10	61	90	21	11	68
23	-	-	-	-	30	9	61
24	-	-	-	-	26	-	74
25	20	12	74	106	19	11	70
26	18	4	83	105	17	4	79
27	35	14	48	97	36	14	50
28	-	-	-	-	42	9	49
29	12	8	65	85	14	10	76
30	34	9	48	91	37	10	53
31	-	-	-	-	26	11	63
32	36	14	59	109	33	12	55
33	20	-	60	80	25	-	75
34	20	16	40	76	26	21	53
35	19	13	11	43	44	31	25
36	26	6	27	59	50	11	39
37	40	-	80	120	33	-	67
38	-	-	-	-	34	8	58
39	23	-	54	77	30	-	70
40	25	18	55	98	25	19	56
41	30	5	61	96	32	5	63
42	21	17	55	93	23	19	58
43	28	5	61	94	30	5	65
44	39	9	43	91	43	10	47

Tabelle 13: Prozentualer Anteil von THF, Allo-THF und THE an der Summe aus diesen 3 Metaboliten, sowie an den veresterten 17-OHCS.

In der Tabelle 13 ist der jeweilige prozentuale Anteil von THF, Allo-THF und THE an der Summe aus diesen 3 Metaboliten (THF + Allo-THF + THE), sowie an den gesamten veresterten 17-OHCS zusammengestellt.

An den veresterten 17-OHCS war THF im Mittel mit 25,9 %, Allo-THF mit 11,3 % und THE mit 55,6 % beteiligt.

An der Summe dieser 3 Cortisolmetaboliten, die im Mittel 91,1 % der veresterten 17-OHCS ausmachten, betrug der Anteil von THF im Mittel 30,0 %, derjenige von Allo-THF 12,6% und derjenige von THE 59,3 %.

Die statistische Auswertung ergab zwischen der Ausscheidung von THF ($P < 0,001$), THE ($P < 0,001$), sowie der Summe aus THF + Allo-THF + THE ($P < 0,001$) und der Bestimmung der veresterten 17-OHCS eine signifikante Korrelation.

Zwischen der Summe der 3 bestimmten Cortisolmetaboliten und den veresterten 17-OHCS ergab sich ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,98$.

Es können demnach rein statistisch 98 % der Veränderungen der veresterten 17-OHCS durch Veränderungen der Summe aus THF + Allo-THF + THE erklärt werden.

Durch den Einzelnachweis von THF, Allo-THF und THE können also die Aussagen, die die Bestimmung der veresterten 17-OHCS über die CORTISOLSEKRETION erlaubt, nicht erweitert oder präzisiert werden.

Störungen des CORTISOLSTOFFWECHSELS und der CORTISOLSYNTHESE können jedoch nur durch den quantitativen Nachweis von Cortisol und seinen Hauptmetaboliten im Urin aufgedeckt werden.

Der Einzelnachweis dieser Steroide im Urin wird deshalb nicht nur besonderen wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten bleiben, sondern allmählich als zusätzliches Hilfsmittel bei der Diagnose dieser Störungen auch eine praktische Bedeutung erlangen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im literarischen Teil der Arbeit wurden die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen über Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol dargestellt.

Im experimentellen Teil wurde eine Methode zum quantitativen Nachweis von Cortisol und Cortison, sowie deren Hauptmetaboliten - Tetrahydrocortisol, Allo-Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison -, im Urin ausgearbeitet. Die einzelnen Schritte dieser Methode wurden diskutiert.

Die tägliche Ausscheidung dieser Steroide wurde bei 15 Normalpersonen, 10 Fettsüchtigen, 3 Patienten nach einer ACTH-Infusion, 1 Normalperson und 2 Fettsüchtigen während eines 24-stündigen Nahrungsentzugs, 5 Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und 7 Patienten mit verschiedenen endokrinen Erkrankungen, untersucht.

Zusätzlich wurde die Hormongruppe der 17-Hydroxycorticosteroide nach PORTER und SILBER in unveresterter und in mit Glukuronsäure veresterter Form im 24-Stundenurin bestimmt.

Es sollte geklärt werden, ob die Aussagen, die aus der Ausscheidung von 17-Hydroxycorticosteroiden über Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol möglich sind, durch den quantitativen Nachweis einzelner Nebennierenrindensteroide erweitert oder präzisiert werden können und ob sich dadurch neue Gesichtspunkte über die Funktion der Nebennierenrinde bei den untersuchten Patienten ergeben.

Von den Fettsüchtigen wurde im Vergleich zu Normalpersonen signifikant mehr Cortisol ($0{,}02 > P > 0{,}01$), Tetrahydrocortisol ($0{,}02 > P > 0{,}01$) und Tetrahydrocortison ($P < 0{,}001$), sowie veresterte 17-Hydroxycorticosteroide ($0{,}01 > P > 0{,}001$) ausgeschieden. Die Ausscheidung der unveresterten 17-Hydroxy-

corticosteroide, sowie von Cortison und Allo-Tetrahydrocortisol stimmte weitgehend mit den bei Normalpersonen gefundenen Werten überein.

Nach einer Infusion von 25 I.E. ACTH stiegen im Vergleich zu den Ausgangswerten, die Ausscheidung sämtlicher untersuchten Steroide (Cortisol, Cortison, Tetrahydrocortisol, Allo-Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison) an. Den stärksten Anstieg zeigte unverestertes Cortisol.

Während eines 24-stündigen Nahrungsentzugs wurden, verglichen mit den Hormonausscheidungen bei normaler Ernährung, vermehrt Nebennierenrindensteroide ausgeschieden. Den prozentual stärksten Anstieg zeigte wiederum Cortisol. Die Tetrahydroverbindungen stiegen im Hunger nur mäßig an.

Bei den Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion war die Ausscheidung aller untersuchten Nebennierenrindensteroide an der unteren Grenze der Norm oder deutlich vermindert.

Die Bestimmung der Cortisolsekretionsrate bei einer Patientin, deren Hormonausscheidung im Vergleich zu Normalpersonen deutlich vermindert war, ergab einen Wert, der in dem für Normalpersonen gefundenen Bereich lag. Wodurch die Diskrepanz zwischen der Ausscheidung von Tetrahydroverbindungen von Cortisol und der Cortisolsekretion bedingt ist, ist nicht geklärt.

Bei einer verminderten Ausscheidung von Corticosteroiden kann demnach nur nach Ausschluß einer Nierenfunktionsstörung auf eine eingeschränkte Nebennierenrindenfunktion geschlossen werden.

Die Hormonanalysen im Urin der Patientin mit endokrinen Erkrankungen ergaben keine neuen Gesichtspunkte über Sekretion und Stoffwechsel von Cortisol. —

Zwischen der Ausscheidung von Cortisol und den unveresterten 17-Hydroxycorticosteroiden, sowie zwischen der Aus-

scheidung von Tetrahydrocortisol und Tetrahydrocortison und den veresterten 17-Hydroxycorticosteroiden bestand eine statistisch signifikante Korrelation.

Durch den Nachweis dieser Steroide können demnach die Aussagen, die aus der Ausscheidung von 17-Hydroxycorticosteroiden über die C O R T I S O L S E K R E T I O N möglich sind, nicht erweitert werden.

Störungen des C O R T I S O L S T O F F W E C H S E L S und der C O R T I S O L S Y N T H E S E können jedoch nur durch die quantitative Bestimmung von Cortisol und seinen Hauptmetaboliten im Urin erfaßt werden.

L I T E R A T U R

1. ROBERTS, S. and C.M. SZEGO:
Ann. Rev. Biochem. 24: 543 (1955)

2. KENDALL, E.C. : Endocrinology 30: 853 (1942)

3. REICHSTEIN, T.: Ergeb. Vitam.- und Hormonforsch. 1: 334 (1938)

4. PFIFFNER, J.J. and H. VARS:
J. biol. Chem. 106: 645 (1934)

5. WINTERSTEIN, O. and J.J. PFIFFNER:
J. biol. Chem. 111: 599 (1935)

6. LOWENSTEIN, B.E., A.C.CORCORAN and J.H.PAGE:
J.clin.Endocrin. 6: 481 (1946)

7. CORCORAN, A.C. and J.H. PAGE:
J.Labor. and clin.Med. 33: 1326 (1948)

8. HEARD, R.D.H. and H. SOBEL:
J. biol. Chem. 165: 687 (1946)

9. STAUDINGER, H.J. und M. SCHMEISSER:
Z.physiol.Chem. 283: 54 (1948)

10. STAUDINGER, H J. und M. SCHMEISSER:
Biochem.Z. 321, 83 (1950)

11. ZIMMERMANN,W.: Z. physiol.Chem. 289: 91 (1952)

12. PORTER, C.C. und R.H. SILBER:
J.biol.Chem. 185: 201 (1950)

13. SILBER, R.H. and C.C. PORTER:
J.biol.Chem. 210: 923 (1953)

14. NORYMBERSKI, J.K., R.D. STUBBS and H.F. WEST:
Lancet 1: 1276 (1953)

15. ZAFFARONI, A., R.B. BURTON and E.H. KEUTMANN:
Science 111: 6 (1950)

16. BURTON, R.B., A. ZAFFARONI and E.H. KEUTMANN:
J.biol.Chem. 188: 763 (1951)

17. BUSH, J.E.: Brit.med. Bull. 10: 229 (1954)

18. NEHER, R. und A. WETTSTEIN:
Helvet.chim.Acta 34: 2278 (1951)

19. COST, W.S., J.J.M. VEGTER, H.DOORENBOS and F.S.P. v.BUCHEN:
First Internat.Congr.of Endocrin. Copenhagen 1960 - Advance Abstracts of Short Communications, S. 1061

20. ROMANOFF, L.P., R.M. RODRIGUEZ, J.M.SEELYE, C. PARENT and G. PINCUS:
J.clin.Endocrinol. and Metab.18: 1285 (1958)

21. GOLD, N.J.: Metabolism 8: 878 (1959)

22. de COURCY, C., J.E. BUSH, C.H. GRAY and J.B. LUNNON:
J.Endocrinol. 9: 401 (1953)

23. BUSH, J.E. and M. WILLOUGHBEY:
Biochem.J. 67: 689 (1957)

24. ROMANOFF, L.P., J. SEELYE, R. RODRIGUEZ and G. PINCUS:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 17: 434 (1957)

25. ROMANOFF, L.P., R.M. RODRIGUEZ, J.M. SEELYE and G.PINCUS:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 17: 777 (1957)

26. ROMANI, J.D., M.ALBEAUX-FERNET et J.CHABOT:
First Internat.Congr.of Endocrin. Copenhagen 1960 - Advance Abstracts of Short Communications S.361

27. GENEST, J., E. KOIW, W.NOWACZYNSKI and T. SANDOR:
Acta Endocrinol. 35: 413 (1960)

28. MEMER, M.M., C.H. GRAY, J.L.LIVINGSTONE and B.LEMNON:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 17: 1168 (1957)

29. DYRENFURTH, J., J.C.BECK and E.H. VENNING:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 20: 751 (1960)

30. GREEN, O.C., C.J.MIGEON and L.WILKINS:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 20: 929 (1960)

31. EBERLEIN, W.R. and A.M. BONGIOVANNI:
J.biol.Chem. 223: 85 (1956)

32. EBERLEIN, W.R. and A.M. BONGIOVANNI:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 15: 1531 (1955)

33. DYRENFURTH, I., S. STYBULSKI, V. NOTCHEV, J.C.BECK and E.H.VENNING:
J.clin.Endocrinol.and Metab. 18: 391 (1958)

34. GOLD, N.J., E. SINGLETON, D.A.MACFARLANE and F.D.MOORE:
J.of clin.Invest. 37: 813 (1958)

35. AYRES, P.J.: Biochemical Society Symposia Number 18
- The Biosynthesis and Sekretion of
Adrenocortical Steroids -
Cambridge University Press 1960, S. 50

36. GRANT, J.K.: Biochemical Society Symposia Number 18
- The Biosynthesis and Sekretion of Adreno-
cortical Steroids -
Cambridge University Press 1960, S. 24

37. PETERSON, R.E. and J.B. WYNGAARDEN:
J.clin. Invest. 35: 552 (1956)

38. FLOOD, C., D.S.LAYNE, S.RAMCHARAN, E.ROSSIPAL,
J.F. TAIT and S.A.S. TAIT:
Acta endocrinol. (Kbh.) 36: 237 (1961)

39. HECHTER, O., E.FRANK, E.CASPI and H.FRANK:
Endocrinol. 60: 705 (1957)

40. PETERSON, R.E.: J.clin.Invest. 39: 320 (1960)

41. LOUCHART, J. and J.W. JAILER:
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 79: 393 (1952)

42. FUKUSHIMA, D.K. and T.F. GALLAGHER:
J.biol.Chem. 226: 725 (1957)

43. AXELROD, L.R. and N.T.WERTHESSEN:
Endocrinology 68: 180 (1961)

44. FUKUSHIMA, D.K., H.L. BRADLOW, L.HELLMAN, B. ZUMOFF:
J.biol.Chem. 235: 2246 (1960)

45. CASPI, E. and O.HECHTER:
J.clin.Endocrinol. 15: 883 (1955)

46. GLENN, E.M., R.O. STAFFORD, S.C. LYSTER and B.J.BOWMAN:
Endocrinology 61: 128 (1957)

47. KERSTEN, H. und Hj. STAUDINGER:
Klin.Wschr. 34: 523 (1956)

48. LEYBOLD, K. und Hj. STAUDINGER:
Biochem. Z. 331: 399 (1959)

49. GRAY, C.H. and J.B. LUNNON
J.Endocrinol. 13: XIX (1956)

50. BURSTEIN, S., K.SAVARD and R.J.DORFMAN:
Endocrinol. 52: 448 (1953)

51. GOLD, N.J., L.L.SMITH and F.D.MOORE:
J.clin.Invest. 38: 2238 (1959)

52. BERG, P. and W.K. JOKLIK:
J.biol.Chem. 210: 657 (1954)

53. TOMKINS, G.M.: Recent Progr.Hormone Res. 12: 125 (1956)

54. SAYERS, G.: Rec.Progr.Hormone Res. 12: 150 (1956)

55. HUEBENER, H.J.: Rec. Progr. Hormone Res. 12: 146 (1956)

56. PETERSON, R.E., C.E.PIERCE and B. KLIMAN:
Arch.Biochem. and Biophys. 70: 614 (1957)

57. FUKUSHIMA, D.K., N.S.LEEDS, H.L.BRADLOW,
T.H. KRITCHEVSKY, M.B. STOKEM and T.F.GALLAGHER:
J.biol.Chem. 212: 449 (1955)

58. ROMANOFF, L.P., C.PARENT, R.M. RODRIGUEZ and G.PINCUS:
J.clin.Endocrinol. and Metab. 19: 819 (1959)

59. EDGREN, R.A., W.E.HAMBURGER and D.W.CALTHOUN:
Endocrinology 65: 505 (1955)

60. KROHN, P.L.: J.Endocrinology 12: 69 (1955)

61. BURSTEIN, S., R.J.DORFMAN and E.M.NADEL:
Arch.Biochem. 53: 307 (1954)

62. FRANTZ, A.G., F.H. KATZ and J.W.JAILER:
First Internat.Congr.of Endocrin. Copenhagen
1960 - Advance Abstracts of Short
Communications, S. 1065

63.
J.clin.Endocrinol. and Metab. 21: 1290 (1961)

64. JAYLE, M.F.: Biochemistry of Steroids, edited by E.MOSETTIG
Proceeding of the 4th International Congress
of Biochemistry,Vienna, Pergamon Press S.44

65. NEHER, R.: Biochemistry of Steroids, edited by E.MOSETTIG
Proceedings of the 4th International Congress
of Biochemistry, Vienna, Pergamon Press S.28

66. ISSELBACHER, K.J.: Rec.Progr.in Hormone Res. 12: 134 (1956)

67. PASQUALINI, J.R.:
Extrait des Comptes rendus des séances de
l'Académie des Sciences, t. 250
p.1929-1931, séance dut mars 1960

68. BUSH, J.E. and A.A. SANDBERG:
J.biol.Chem. 205: 783 (1953)

69. NELSON, D.H., L.T.SAMUELS, D.G.WILLARDSON and F.H. TYLER:
J.clin.Endocrin. 11: 1021 (1951)

70. BLISS, E.L., A.A.SANDBERG, D.H.NELSON and K.EIK-NES:
J.clin.Invest. 32: 818 (1953)

71. KARL, H.J. und M. TORBICA:
Klin.Wschr. 38: 110 (1960)

72. TAMM, J.: Klin.Wschr. 34: 346 (1956)

73. BONGIOVANNI, A.M.: J.clin.Endocrin.and Metab. 14: 341 (1954)

74. TAMM, J., D. BUSCH und K.D. VOIGT:
Klin.Wschr. 36: 297 (1958)

75. COHN, G.L. and P.K. BONDY:
J.biol.Chem. 234: 31 (1959)

76. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 35: 1428 (1956)

77. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 35: 1434 (1956)

78. WESTPHAL, U., H.E.FIRSCHEIN and E.M.PEARCE:
Science 121: 601 (1955)

79. WESTPHAL, U.: Endocrinology 57: 456 (1955)

80. SANDBERG, A.A., W.R.SLAUNWHITE and H.N.ANTONIADES:
Rec. Progr. Hormone, Res. VOL.XIII S.209

81. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 37: 511 (1958)

82. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 36: 881 (1957)

83. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 37: 519 (1958)

84. SLAUNWHITE, W.R. and A.A. SANDBERG:
J.clin.Invest. 38: 384 (1959)

85. DAUGHADAY, W.H.: J.clin.Invest. 39: 885 (1959)

86. SILBER, R.H.: Abzug des Vortrags: "The Validity of Hormone Assays Applicable to Clinical Medicine" gehalten auf dem 1.Internationalen Kongress für Endocrinologie 1960 in Kopenhagen

87. NEHER, R.: Chromatographie von Sterinen und Steroiden und verwandten Verbindungen
Elsevier Verlag 1958

88. HUEBENER, H.J., E.HOFFMANN und F.BODE:
Hoppe Seylers Z. 289: 102 (1952)

89. ZAFFARONI, A.: J.Amer.chem.Soc. 72: 3828 (1950)

90. SMITH, E.E.B. and G.T. MILLS: Biochem.J. 54: 164 (1953)

91. LEVVY, G.A.: Biochem.J. 52: 464 (1952)

92. STEMPFEL, R.S., J.B.SIDBURY and C.J.MIGEON:
J.clin.Endocrin. and Metab. 20: 814 (1960)

93. VOIGT, K.D., M.LEMMER und J.TAMM:
Biochem.Z. 331: 356 (1959)

94. VOIGT, K.D. und E.KLEMPIEN:
First Internat.Congr.of Endocrin. Copenhagen 1960 - Advance Abstracts of Short Communications S.1043

95. GLENN, E.M. and D.H. NELSON:
J.clin.Endocrin. and Metab. 12: 911 (1953)

96. JOHNSON, D.F., E.H. HEFTMANN and A.L.HAYDEN:
Acta Endocr. 23: 341 (1956)

97. TAMM, J., D.BUSCH und K.D.VOIGT:
Klin.Wschr. 36: 297 (1958)

98. VOIGT, K.D.: Klin.Wschr. 38: 206 (1960)

99. KORNEL, L. and R. HILL jr.: Metabolism 10: 18 (1961)

100. WALSER, A.: Schweiz.Med.Wschr. 89: 1215 (1959)

101. BORTH, R., A. LINDER and A. RIONDEL:
Acta Endocrin. (Kbh.) 25: 33 (1957)

102. SZENAS, P. and C.J. PATTEE:
J.clin.Endocrin. and Metab. 19: 344 (1959)

103. COPE, C.L. and E.G. BLACK:
Brit.Med.J. __: 1117 (1959)

104. SCHEDL, H.P., P.S.CHEN jr., G. GREENE and D. REDD:
J.chlin.Endocrin. and Metab. 19: 1223 (1959)

105. KARL J. und L. RAITH: in Vorbereitung

106. WEISSBECKER, L. und W. RUPPEL:
Verh.dtsch.Ges. inn.Med. 58: 225 (1952)

107. WILLARDSON, D.G., E.ENGLERT and H. BROWN:
Clin.Res.Proc. 3: 137 (1955)

108. DAUGHADAY, W.H. and R. BRENNER:
J.Lab.and Clin.Med. 46: 807 (1955)

109. LIDDLE, G.W., D.ISLAND, E.M. LANCE and A.P.HARRIS:
J.clin.Endocrin. 18: 906 (1958)

ANHANG : VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

1. F = Cortisol = 11ß,17α,21-trihydroxy-4-pregnen-3,20-dion
2. E = Cortison = 17α,21α-dihydroxy-4-pregnen-3,11,20- trion
3. THF = Tetrahydrocortisol = 3α,11ß,17α,21-tetrahydroxy-pregnan-20-on
4. Allo-THF = Allotetrahydrocortisol = 3α,11ß,17α,21-tetrahydroxy-5-pregnan-20-on
5. THE = Tetrahydrocortison = 3α,17α,21-trihydroxy-pregnan-11,20-dion
6. Reichstein's Substanz S = 11-Desoxycortisol = 17α,21-dihydroxy-3,20-dion.
7. ACTH = Adrenocorticotropes Hormon
8. 17-OHCS = 17-Hydroxycorticosteroide

LEBENSLAUF

Am 14. März 1936 wurde ich als Sohn des Baumeisters Ludwig Raith und seiner Ehefrau Anna Raith, geborene Ettlinger in München geboren.

Nach Beendigung der 5. Klasse der Volksschule trat ich im Jahre 1947 in die Ludwigs-Oberrealschule in München ein, an der ich nach 9 Klassen im Juni 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich das medizinische Studium an der Ludwigs-Maximilian Universität München und bestand dort im April 1959 das Physikum.

Am 7. VI. ~~Im Frühjahr~~ 1962 legte ich das medizinische Staatsexamen in München ab.

Herrn Professor Dr.H.Schwiegk danke ich,
daß ich an seiner Klinik und in seinem Labor
arbeiten durfte.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr.med. J. Karl
für die Überlassung des Themas, sowie für die
wohlwollenden Ratschläge und die Hilfe, die er
mir während meiner Arbeit zukommen ließ, danken.